

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

par

Gerard TIRABY

Maître-Assistant

ETUDE DES MECANISMES MOLECULAIRES RESPONSABLES DES EFFICACITES DE TRANSFORMATION CHEZ DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE



Ce travail a été effectué sous la direction du Professeur M. SICARD, au laboratoire de Génétique de Toulouse et sous la direction du Professeur M.S. FOX, au laboratoire de Génétique Microbienne du Massachusetts Institute of Technology (M.I.T.).

Soutenue le 19 Juin 1974 devant la Commission d'Examen

MM. J.P. ZALTA

Président

M.S. FOX
R. ROSSET
J.L. ROSSIGNOL
M. SICARD

} Examineurs

THESE

LE CHAIR DE MATHÉMATIQUES NATURELLES

CHRYSE TIFANY

Digitized by the Internet Archive
in 2026

RESPONSABLES DES ÉQUIPES DE TRANSFORMATION
CHEZ MYCOCOCOS PHARMACIE

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

par

Gerard TIRABY

Maître-Assistant

ETUDE DES MECANISMES MOLECULAIRES RESPONSABLES DES EFFICACITES DE TRANSFORMATION CHEZ DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE



Ce travail a été effectué sous la direction du Professeur M. SICARD, au laboratoire de Génétique de Toulouse et sous la direction du Professeur M.S. FOX, au laboratoire de Génétique Microbienne du Massachusetts Institute of Technology (M.I.T.).

Soutenue le 19 Juin 1974 devant la Commission d'Examen

MM. J.P. ZALTA

Président

M.S. FOX
R. ROSSET
J.L. ROSSIGNOL
M. SICARD



Examineurs

THÉSE

LIBRARY

ETUDE DES MECANISMES MOLECULAIRES
RESPONDANT A DES EFFICACITES DE TRANSFORMATION
DES OPIOIDES PHARMACOLOGES



De l'Institut de Chimie de l'Université de Leiden, sous la direction de M. J. H. van der Vliet, en vue de l'obtention du grade de Docteur en Chimie.

Présentée par M. J. H. van der Vliet

Leiden, le 15 Mars 1964

et

le 15 Mars 1964

et

le 15 Mars 1964

UNIVERSITE PAUL SABATIER

TABLEAU DU PERSONNEL SCIENCES

DIRECTION DE L'UNIVERSITE

M. LARENG	Président
M. MATHIS	1er Vice-Président
M. MARTIN	2ème Vice-Président

U.E.R. SCIENTIFIQUES

HONORARIAT

M. BEDOS	Professeur honoraire
M. BLAIZOT	Doyen honoraire
M. CAPDECOMME	Doyen honoraire, Recteur honoraire correspondant de l'Institut
M. DIEHL	Professeur honoraire
M. DUPOUY	Membre de l'Institut, Doyen honoraire, Directeur Général honoraire du C.N.R.S., Professeur honoraire
M. DURAND Emile	Doyen honoraire
M. ESCANDE	Professeur honoraire, Membre de l'Institut
M. GAUSSEN	Professeur honoraire, Correspondant de l'Institut
M. JACQUES	Professeur honoraire
M. MASDUPUY	Professeur honoraire
M. MATHIS	Doyen honoraire
M. MIGNONAC	Professeur honoraire
M. MORQUER	Professeur honoraire, Correspondant de l'Institut
M. SECONDAT	Professeur honoraire
M. TEISSIE-SOLIER	Professeur honoraire
M. VANDEL	Professeur honoraire, Membre de l'Institut

PROFESSEURS

M. CASTERAS	Géologie, Correspondant de l'Institut
M. CAPDECOMME	Minéralogie, Correspondant de l'Institut
M. NOUVEL	Biologie Générale
M. GALLAIS	Chimie, Membre de l'Institut
M. DURAND Emile	Physique
M. FERT	Physique
M. LESBRE	Chimie Organique
M. HURON	Mathématiques Appliquées
M. MARGULIS	Pédologie
M. TRICHE	Chimie Analytique et Spectrographie
M. LEDOUX	Zoologie Appliquée
M. RIVALS	Agriculture
M. PERRIER	Physique
M. MATHIS	Chimie
M. ORLIAC	Géochimie et Minéralogie
M. LAFOURCADE	Physique
M. ANGELIER	Ecologie
Mlle de FERRE	Botanique
M. FARRAN	Minéralogie et Géotechnique
M. LAUDET	Physique Théorique et Calcul Numérique
M. SERFATY	Biologie Animale
M. LAGASSE	Electrotechnique
M. BLANC	Physique Nucléaire
M. LEREDDE	Botanique
M. LELUBRE	Géologie
M. TROCHAIN	Botanique
M. LALAGUE	Mathématiques Générales
M. BOUIGUE	Astronomie
M. COUCHET	Physique
M. ASSELINEAU	Chimie Biologique
M. MAURET	Chimie Systématique
M. AGID	Physiologie

M. MONTANT	Cryptogamie
M. GAUTIER	Physique
M. CRUMEYROLLE	Mathématiques
M. GOURINARD	Géologie
M. PULOU	Minéralogie
M. CAMBOU	Physique Spatiale
M. LACOSTE	Electrotechnique
M. THIBAUT	Mécanique Rationnelle et Appliquée
M. MASCART	Mathématiques
M. MEDIONI	Psychophysiologie
M. RAYNAUD Pierre	Physiologie Animale
M. ZALTA	Chimie Biologique
M. SEVELY	Electrotechnique
M. POMMIEZ	Mathématiques
M. REY Paul	Biologie Végétale
M. COULOMB	Physique
M. TRINQUIER	Physique
M. MARONI	Chimie
M. BEETSCHEN	Biologie Générale
M. DERACHE	Physiologie Animale
M. SATGE	Chimie Organique
M. LATTES	Chimie
M. VEDRENNE	Géophysique
M. DURAND-DE LGA	Géologie
M. CARRARA	Physique
M. JEANNIN	Chimie Minérale
M. MAHENC	Chimie
M. MIROUZE	Géologie
M. BITSCH	Zoologie
M. DEGEILH	Physique
M. MARTIN J.C.	Génie Electrique
M. REY Gérard	Electronique, Electrotechnique, Automatique

PROFESSEURS ASSOCIES

M. ANDERSON	Physique Spatiale
-------------------	-------------------

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. PICCA	Physique
M. MERIC	Mathématiques Appliquées
Mme LECAL	Zoologie
M. PILOD	Physique
M. LARROQUE	Physique
M. BARRANS	Chimie
Mlle LAPEYRE	Mathématiques - Informatique
M. BERTRAND	Chimie
M. DESQ	Mathématiques
M. ROCARD	Electronique
M. POILBLANC	Chimie
M. TOUZE	Physiologie Végétale
M. FRASNAY	Mathématiques
M. CASSAGNAU	Zoologie
M. GUERIN	Mathématiques
M. PESCIA	Physique
M. SOUQUET	Géologie
M. SCHNEIDER	Biologie Cellulaire
M. SICARD	Biologie Génétique
M. de LOTH	Chimie Physique
M. SAPORTE	Physique
M. PERENNOU	Informatique
M. THENOZ	Génie Civil
M. CAUSSINUS	Mathématiques Appliquées
M. DURAND Ph.	Physique
M. CASTAN	Informatique
M. REME	Mesures Physiques

M. FONTAN	Physique Nucléaire
M. BAUDRAS	Chimie Biologique
M. CALVET	Mécanique des Fluides
M. PAGANI	Physique
M. BEAUFILS	Informatique
M. BERTHELEMY	Zoologie
M. TERJANIAN	Mathématiques

MAITRES DE CONFERENCES

M. ATTEIA	Mathématiques
M. CUPPENS	Mathématiques
Mlle BARBANCE	Mathématiques
M. VERDIER	Physique
M. GILLY	Génie Mécanique
M. COTTU	Génie Mécanique
M. ROUTIE	Génie Chimique
M. MARAL	Physique
M. HURAUX	Physique
M. LEGRAND	Génie Civil
M. ABATUT	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. SOTIROPOULOS	Chimie Organique
Mme GERVAIS	Chimie Inorganique
M. BONEL	Chimie
M. MAUSS	Mécanique
M. BANCEL	Mathématiques
M. JOSSERAND	Mesures Physiques
M. BETOURNE	Informatique
M. CAMPAN	Psychophysiologie
M. CLERC	Mécanique
M. GRIFONE	Mathématiques
M. ETTINGER	Mathématiques
M. LETAC	Mathématiques
M. BONNET Louis	Biologie
M. LOUARN	Génétique

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

M. BACCAR	Chimie Organique
-----------	------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M. PRADINES	Mathématiques
M. NGUYEN THANH VAN	Mathématiques
M. GALINIER Michel	Informatique

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

PROFESSEURS

M. NOUGARO	Hydraulique Générale et Appliquée
M. GARDY	Génie Chimique
M. BIREBENT	Electronique Appliquée
M. VOIGT	Chimie Minérale
M. MONTEL	Chimie Physique et Electrochimie
M. THIRRIOT	Hydrodynamique (E.N.S.E.F.I.H.T.)
M. GRUAT	Mécanique des Fluides (Hydraulique)
M. BUGAREL	Génie Chimique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. HAMANT	Botanique
Mlle BERDUCOU	Physiologie Végétale
M. DAT	Mécanique des Fluides

M. FALLOT	Biologie Végétale (Viticulture et Arboriculture)
M. TRUCHASSON	Mécanique
M. HOFFMANN	Electronique
M. ENJALBERT	Chimie
M. MARTY	Physique Industrielle
M. LEFEUVRE	Electronique (E.N.S.E.F.I.H.T.)
M. ANGELINO	Génie Chimique
M. DABOSI	E.N.S.C.T.

MAITRES DE CONFERENCES

M. MATHIEU	Chimie Analytique
M. TRANNOY	Physique (E.N.S.E.F.I.H.T.)
M. CASTAGNETTO	Mathématiques (E.N.S.E.F.I.H.T.)
M. GILOT	Génie Chimique (Institut du Génie Chimique)
M. CALMON	Techniques Agricoles
M. MATHEAU	Electronique

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M. NOAILLES	Informatique
-------------	--------------

INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE

PROFESSEURS

M. ROQUES	Chimie Industrielle
M. GRATELOUP	Génie Electrique
M. MASO	Génie Civil
M. MIRA	Génie Electrique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. COLETTE	Physique
M. FAGET	Physique
M. DURAND Gilbert	Chimie
M. SCHUTTLER	Physique

MAITRES DE CONFERENCES

M. LETURCO	Génie Electrique
M. SIRIEYS	Génie Civil
M. BROUSSEAU	Physique
M. BESOMBES-VAILHE	Chimie
M. VERDIER Alain	Chimie

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M. LACAZE	Mathématiques
-----------	---------------

☆☆

ADMINISTRATION

M. PRINEAU	Secrétaire Général de l'Université
------------	------------------------------------

AVANT - PROPOS

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé dans le laboratoire de génétique dirigé par le Professeur Michel Sicard à l'Université Paul Sabatier de Toulouse (Septembre 1967 - Juin 1971), puis dans le laboratoire de génétique microbienne du Professeur Maurice Fox à l'Institut de Technologie du Massachusetts à Boston (Etats-Unis) (Juillet 1971 - Octobre 1973), et enfin, durant un court stage, dans le laboratoire de bactériologie du Professeur Harriet Bernheimer au Downstate Medical Center à New York (Juillet 1973).

Avant d'exposer les résultats obtenus, je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur le Professeur Sicard, à qui je dois ma carrière d'enseignant et qui a bien voulu me confier l'étude d'un phénomène à la compréhension duquel il avait lui-même apporté une importante contribution. Il m'a appris à persévérer dans les longues périodes improductives et à maîtriser mon penchant naturel à vouloir entreprendre trop d'expériences à la fois. Nos relations personnelles sont allées bien au-delà des problèmes scientifiques et nos contacts ont toujours été empreints d'estime réciproque et de cordialité. Qu'il sache que ma reconnaissance lui sera toujours acquise.

Il m'est particulièrement agréable d'adresser à Monsieur le Professeur Fox, mes plus chaleureux et sincères remerciements. Dans son laboratoire où j'ai pu continuer mon travail sur la transformation, j'ai bénéficié, non seulement de conditions matérielles idéales, mais de plus j'ai largement profité de ses conseils et critiques qu'il me prodiguait tout au long de nos discussions journalières. Son influence sur le développement de ma pensée scientifique et sur ma vision du monde aura été sans aucun doute importante. Je lui sais gré d'avoir bien voulu accepter de venir à Toulouse pour la soutenance et lui renouvelle ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier Madame le Professeur Harriet Bernheimer qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire pour m'initier à certaines techniques et me donner accès à sa collection unique de souches transformables de pneumocoque.

C'est le Professeur Zalta, qui a été à l'origine de ma vocation de généticien, en me conseillant de rendre visite à Monsieur Sicard, alors à Paris. Je le remercie aussi d'avoir toujours témoigné de l'intérêt pour mon travail et d'avoir bien voulu présider le jury de cette thèse.

J'ai eu la chance de pouvoir bénéficier de l'enseignement du Professeur Rossignol à la Faculté de Sciences d'Orsay. Son insistance à vouloir faire réfléchir à partir de ce que d'autres nous avaient appris a été pour moi une expérience extraordinaire. Je suis très honoré qu'il fasse partie du jury et l'en remercie.

Mes relations avec le Professeur Rosset remontent au jour où nous nous sommes rencontrés chez des amis communs à Boston. Je suis content que la soutenance

de cette thèse me permette de les développer. Je le remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

Il m'est agréable de remercier tous mes camarades qui, de près ou de loin, ont été associés à ce travail. Ils m'ont souvent aidé et stimulé par leur disponibilité, leur compétence, leur amitié. Je ne peux les citer tous. Je voudrais cependant que chacun d'eux, personnellement, trouve ici l'expression de mon amicale reconnaissance.

Ma reconnaissance va également à l'ensemble du personnel technique tant aux laboratoires de Toulouse que du M. I. T. pour sa collaboration efficace et amicale.

"... among molecular geneticists, many had been loath to learn the black art of pneumococcus manipulation".

Gunther STENT dans *MOLECULAR GENETICS*.

INTRODUCTION

Dans son sens le plus large, la recombinaison génétique peut être définie comme étant l'interaction de deux molécules de DNA ou de deux régions d'une même molécule, qui conduit à un changement de la séquence des bases. Cette définition recouvre chez les procaryotes, non seulement la recombinaison après conjugaison, transduction, transformation ou infection phagique multiple, mais aussi les événements conduisant à une délétion ou à une insertion d'une certaine longueur de DNA, donnant naissance par exemple à l'intégration du prophage.

De toutes ces possibilités, la transformation bactérienne est l'un des systèmes de recombinaison les plus simples puisqu'elle implique seulement l'interaction d'un fragment de DNA donateur avec le génome de la cellule réceptrice. Le DNA facile à purifier et à manipuler, peut être traité par divers agents chimiques ou physiques comme les radiations, ou être marqué par des isotopes lourds ou radioactifs ou être fractionné. De tous les processus qui interviennent au niveau du matériel héréditaire - transcription, duplication, réparation, recombinaison, seul ce dernier n'a pu encore être réalisé in vitro. Mais la transformation bactérienne, avec la possibilité qu'elle offre de faire intervenir directement le DNA est un outil de choix pour cette réalisation. Cependant, avant de pouvoir réussir la recombinaison dans un tube à essai, il est sûrement nécessaire de mieux connaître les différentes étapes telles qu'elles se produisent in vivo. Car de toutes les recherches effectuées à ce jour, il apparaît que la recombinaison génétique est un phénomène complexe qui semble présenter une grande diversité selon l'organisme auquel on s'adresse. C'est ainsi que WHITEHOUSE (132) dans une revue générale sur la recombinaison génétique, distingue, chez les procaryotes, quatre systèmes différents. Ce sont :

- Le système Int qui intervient pour l'intégration du phage λ
- Le système Red qui contrôle en partie, la recombinaison chez le phage λ
- Le système Rec mis en évidence chez *E. coli*
- Le système de transformation du pneumocoque.

Le travail présenté dans ce mémoire concerne l'étude de ce dernier type de recombinaison chez la bactérie *Diplococcus pneumoniae*. Il s'inscrit dans la ligne des travaux entrepris par EPHRUSSI-TAYLOR, SICARD et LOUARN.

Pour définir le cadre de nos recherches, nous rappellerons brièvement les principaux faits connus sur la transformation chez le pneumocoque.

LA TRANSFORMATION BACTERIENNE CHEZ LE PNEUMOCOQUE

Lorsque à une culture de pneumocoques sensibles à la streptomycine, on ajoute une solution de DNA purifié extrait d'une culture de pneumocoques résistants à la streptomycine, on constate l'apparition, dans certaines conditions, d'un grand nombre de bactéries résistantes à cet antibiotique. Ces bactéries qui sont devenues résistantes à la streptomycine ont été transformées pour cette nouvelle propriété grâce au DNA donateur. Les marqueurs génétiques utilisés dans la transformation du pneumocoque sont principalement des marqueurs conférant la résistance à divers antibiotiques mais parfois aussi, des marqueurs d'auxotrophie. Dans les meilleures expériences, une bactérie réceptrice sur dix peut être transformée dans le cas des marqueurs les plus efficaces. Cependant selon le marqueur considéré, le nombre de bactéries transformées peut varier dans une même expérience de transformation faisant intervenir un DNA transformant porteur de plusieurs marqueurs génétiques. Selon les efficacités avec lesquelles les marqueurs sont intégrés de façon stable dans le génome de la bactérie réceptrice, ceux-ci sont groupés en plusieurs classes. Rapidement il est apparu que cette discrimination observée entre les divers marqueurs est sous la dépendance d'un mécanisme propre à la bactérie réceptrice.

Au cours de la dernière décennie de nombreuses expériences de nature physico-chimique et génétique ont été effectuées dans le but de mieux comprendre les mécanismes qui d'une part aboutissent à l'intégration stable des marqueurs et d'autre part conduisent à une discrimination entre les marqueurs. Nous allons présenter les données sur le mode d'intégration des marqueurs, résultant de ces multiples expériences et également les données concernant plus particulièrement les efficacités différentielles des marqueurs.

L'INTEGRATION DES MARQUEURS

L'intégration physique du DNA transformant dans le génome récepteur est aujourd'hui admise. Les premiers résultats sont dus à FOX (30). Après transformation par un DNA très fortement marqué au P^{32} puis réextraction du DNA des bactéries transformées, il a étudié la cinétique de l'inactivation de l'activité biologique en fonction de la désintégration du P^{32} . Cette cinétique est la même que pour le DNA initial, ce qui tend à indiquer que l'information génétique du marqueur transformant est encore, après intégration, dans du DNA radioactif.

De son côté, LACKS (56) a montré que le DNA donateur réextrait immédiatement après la pénétration et chromatographié sur DEAE cellulose, se retrouve sous forme monocaténaire. Cette particularité expliquait le phénomène de l'éclipse découvert par FOX (29) : le DNA extrait des bactéries dans les premières minutes de

la transformation a perdu l'activité transformante donatrice, l'activité réapparaît pour des temps plus longs après la pénétration. Comme le DNA monocaténaire n'est pas absorbé dans les bactéries compétentes, l'éclipse correspondrait au clivage des molécules de DNA transformant en brins monocaténaires.

FOX et ALLEN (31) ont montré que la transformation génétique du pneumocoque pourrait être réalisée par l'insertion d'un fragment du DNA transformant dans le génome de la bactérie réceptrice. Leurs expériences consistaient à traiter des bactéries compétentes avec du DNA très marqué par les isotopes lourds ^2H et ^{15}N . Le DNA alourdi est séparable du DNA léger (^1H , ^{14}N) et aussi de l'hybride moléculaire constitué de DNA alourdi et léger, par centrifugation à l'équilibre dans un gradient de densité. Le DNA extrait des bactéries réceptrices peu de temps après le contact avec le DNA donateur lourd, contient des fragments intacts du DNA donateur sous forme d'un hybride avec le DNA récepteur léger. Ces résultats seront confirmés par GURNEY et FOX (46) qui estimeront la taille du fragment du DNA intégré à environ $2-3 \cdot 10^6$ daltons. Cette valeur correspond à environ la moitié de la taille moyenne du DNA donateur fixé sur la surface des bactéries compétentes (78-79-80). En effet, et ceci est une autre caractéristique de la transformation, MORRISSON et GUILD (79) ont montré que le DNA transformant subissait des cassures simultanées sur les deux brins dans les toutes premières réactions entre le DNA et les composants de la surface bactérienne.

Parallèlement aux techniques physico-chimiques qui ont apporté des éclaircissements sur le devenir du DNA fixé par les cellules, des études génétiques fines ont été entreprises. La notion la plus remarquable qui se dégage de ces études est celle d'efficacité qui est la probabilité d'intégration dans le génome, d'un fragment de DNA transformant ayant pénétré dans la bactérie. D'après leur efficacité de transformation, les marqueurs d'auxotrophie comme ceux de résistance aux antibiotiques peuvent être groupés en plusieurs classes. Ainsi chez le pneumocoque un marqueur génétique sera caractérisé par son efficacité, autant que par son phénotype et son emplacement sur le génome. C'est là une donnée génétique nouvelle, qui ne semble pas évidente dans le cas des autres systèmes de recombinaison.

Comme notre travail a été consacré à mieux comprendre cette caractéristique particulière du pneumocoque que représente l'efficacité différentielle des marqueurs, nous présenterons l'ensemble des données relatives aux efficacités des marqueurs, accumulées au cours des dernières années.

LES EFFICACITES DES MARQUEURS

a) Classes d'efficacité

En 1959, GREEN (41) a constaté une différence dans la fréquence relative de transformation pour deux marqueurs du pneumocoque. IYER et RAVIN (54) ont étendu cette observation à d'autres marqueurs d'un même locus. Mais ce sont EPHRUSSI-

TAYLOR, SICARD et KAMEN (26) qui, en 1965, ont montré l'importance de la notion d'efficacité à la suite de la constatation qu'ils avaient faite que les marqueurs situés dans le locus *ami-A*, responsables de l'augmentation de résistance à l'aminop-
térine, pouvaient être groupés en deux classes : une classe à forte efficacité (HE pour "High efficiency") et une classe à faible efficacité (LE pour "Low efficiency"). Les marqueurs de la première classe ont une efficacité d'intégration de 6 à 10 fois supérieure à ceux de la deuxième classe. D'autres mutants du même locus, isolés ultérieurement, après action d'agents mutagènes divers, se rangent dans ces deux classes (40). L'analyse génétique effectuée par MORSE et LERMAN (81) à partir d'un groupe de 12 mutants d'exigence en uracile induits par l'acide nitreux a montré que 11 mutants étaient de type LE et un de type HE. De même FRIEDMAN et RAVIN (35) ont trouvé 2 classes pour plusieurs mutants exigeant la thymidine pour leur croissance.

Les 80 mutants, déficients pour la synthèse de l'amyloamylase, étudiés par LACKS (58), se rangent non pas dans deux mais dans quatre classes d'efficacité. Les deux classes supplémentaires correspondent à une classe dont l'efficacité est plus élevée que celle des marqueurs HE, marqueurs VHE (pour "very high efficiency") et à une classe dont l'efficacité est moins élevée que celle des marqueurs HE, marqueurs IE (pour "intermediary efficiency"). De même, SIROTNAK et HACHTEL (108) ont retrouvé ces quatre classes pour 47 mutants du gène de structure de la dihydrofolate réductase. Des mutants avec une efficacité supérieure à la classe HE ont été également isolés dans le locus de résistance aux sulfonamides (51).

Les efficacités des mutations multisites de petite taille sont en général fortes mais pour les mutations de taille plus importante, les efficacités varient selon un spectre très étendu, avec des valeurs extrêmes pouvant être plus faibles que celles trouvées pour les marqueurs LE (54) ; (58). Les travaux de LACKS (58) suggèrent, mais ne permettent cependant pas d'affirmer, qu'il existe une proportionnalité entre la baisse d'efficacité et la longueur de la région mutée.

b) Nature des mutations

L'efficacité d'un marqueur est indépendante du sens de croisement, que l'on transforme la souche sauvage par du DNA du mutant ou la souche mutante par du DNA sauvage (103) ; (58). Les marqueurs HE ou LE ne sont pas localisés dans une région spécifique d'un locus, mais peuvent se trouver dans beaucoup de sites de ce locus (26) ; (58) ; (108) ; (81).

L'acide nitreux et la nitrosoguanidine induisent préférentiellement des mutations à faible efficacité (104) ; (81). Il en est de même pour l'hydroxylamine (36). La faible mutagénicité de l'éthyl méthane sulfonate et du rayonnement ultraviolet, chez le pneumocoque, rend difficile la détermination

des efficacités des mutations provoquées par ces agents (LACKS, (58) ; STROTNAK et HACHTEL, (108). GRAY (cité dans GRAY et EPHRUSSI-TAYLOR, (40)) a trouvé que les efficacités des mutations induites par la proflavine varient de 0,1 à 2 (par rapport à *str-r41*) alors que SICARD (104) a constaté une prédominance de mutations LE avec cette même substance. Aucun agent mutagène n'est connu pour induire principalement les mutations à forte efficacité. La fréquence la plus élevée de mutants HE est trouvée parmi les mutants apparus spontanément.

L'étude des réversions de plusieurs mutations LE et HE du locus *ami-A* a permis d'affirmer que les mutations de ces deux classes étaient ponctuelles (105).

Au cours de l'analyse génétique d'un groupe de mutants du locus *mal⁻*, LACKS (58) a découvert que deux mutants d'un même site ont des efficacités différentes. Mais lorsque la réversion de l'un de ces deux mutants est utilisée comme souche réceptrice, leurs efficacités deviennent approximativement inversées, fort pour faible. Si un seul site est impliqué, trois changements de base peuvent alors s'y produire. Plusieurs mutants du locus *ami-A* donnent également des réversions dans lesquelles l'efficacité du mutant dont chacune d'elles est issue, est changée (105). Des marqueurs à faible efficacité dans la souche sauvage deviennent à forte efficacité dans leur réversion. SICARD (104) a trouvé également un cas où l'efficacité d'un marqueur déjà HE devient plus élevée dans sa réversion.

Les travaux sur la transformation hétérospécifique entre le pneumocoque et le streptocoque, menés par CHEN et RAVIN (13) ; BISWAS et RAVIN (8) suggèrent que ce sont la nature de la mutation et celle de son voisinage qui, ensemble, déterminent l'efficacité d'un marqueur.

c) Mode de transmission de l'information portée par les marqueurs LE

Par une méthode nouvelle d'analyse clonale, LOUARN et SICARD (68) ont montré que les marqueurs HE transmettent leur information à un seul brin de la molécule réceptrice, alors que les marqueurs LE la transmettent aux deux brins. Cette forme de transmission pour les marqueurs LE ne correspond pas à l'insertion des deux brins de l'ADN donateur dans le génome de la bactérie (69). Ce résultat concorde avec l'observation de EPHRUSSI-TAYLOR et GRAY (27) selon laquelle les marqueurs HE sont transmis aux cellules filles à la 3ème génération après la pénétration, tandis que les marqueurs LE sont transmis à la descendance à la 2ème génération.

Le processus qui intervient pour rendre homozygote la molécule de DNA réceptrice, pour un marqueur LE, s'effectue après que les échanges génétiques se soient déjà produits. En effet, les efficacités des marqueurs ne modifient pas la distance entre les marqueurs bien que le nombre de recombinaisons soit différent en valeur absolue (26 - 58 - 81). En outre, dans la transformation de deux marqueurs en position *trans*, c'est l'efficacité du marqueur porté par le chromosome récepteur, et non l'efficacité du marqueur présent dans l'ADN donateur qui intervient pour

l'apparition de recombinaisons de type sauvage (26).

Au cours de ce processus, une grande partie de l'information des marqueurs LE est détruite. Ce phénomène a été observé par EPHRUSSI-TAYLOR (24) à la suite d'une expérience faisant intervenir le marqueur *str-r41* à forte efficacité et le marqueur *opt-r2* à faible efficacité. Le rapport des transformées *opt-r* sur *str-r* est de 1 à 16 avec le DNA recombinant reextracté dès la fin de l'éclipse, tandis qu'avec des temps croissants d'incubation, ce rapport diminue graduellement jusqu'à une valeur constante de 1 à 64.

Les marqueurs LE se distinguent aussi des marqueurs HE par le fait que leur activité biologique réapparaît plus tôt après la période de l'éclipse (37)

d) Exclusion d'un marqueur HE par un marqueur LE en position Cis

LACKS (58) a montré en transformant la souche sauvage par un DNA porteur de deux mutations, que l'efficacité d'intégration d'un marqueur HE est réduite par la présence d'un marqueur LE lié. SICARD et EPHRUSSI-TAYLOR (106) ont observé un effet analogue lorsque des réversions de certaines mutations du locus *ami-A* sont transformées par les marqueurs HE de ce locus. Cet effet est appelé exclusion. L'effet est seulement négatif puisqu'il n'y a pas d'augmentation de l'intégration des marqueurs à faible efficacité par la présence d'un marqueur à forte efficacité. De plus, l'efficacité des marqueurs à faible efficacité n'est pas diminuée par la présence d'un autre marqueur à faible efficacité. Plus le marqueur HE est près, plus l'exclusion est forte. Si la bactérie réceptrice renferme elle aussi le marqueur LE, l'efficacité du marqueur HE restera normale.

Un résultat identique a été trouvé par GRAY et EPHRUSSI-TAYLOR (40), en utilisant des doubles mutants du locus *ami-A*. Ces auteurs ont de plus signalé que l'exclusion serait polarisée, c'est-à-dire qu'elle serait plus prononcée d'un côté du marqueur LE que de l'autre. Toutefois, une telle polarité ne ressort pas des travaux de SICARD (104) et de LOUARN (65) sur l'exclusion provoquée par la réversion de certains marqueurs du locus *ami A*, sur les mutations HE de ce gène.

e) Action de certains agents chimiques et physiques sur le DNA transformant : influence sur l'efficacité

L'acide nitreux peut réagir avec le DNA *in vitro*. Il en résulte une inactivation de ce DNA, la formation de lésions peut entraîner, par transformation, l'apparition de mutants à faible efficacité (LITMAN, (64) ; SICARD, (103). L'inactivation se traduit par une diminution de l'activité biologique, identique pour les deux classes de marqueurs (LITMAN, (64).

La DNase pancréatique provoque, *in vitro*, une inactivation préférentielle de certains marqueurs qui semble être fonction, non pas de l'efficacité de ces marqueurs, mais de la taille de la mutation (58).

L'action du rayonnement ultraviolet sur le DNA transformant apparaît plus complexe. En effet, la sensibilité aux rayonnements ultraviolets des marqueurs LE est beaucoup plus grande que celle des marqueurs HE pour le locus *ami-A*. Une corrélation inverse entre la sensibilité et l'efficacité d'incorporation a été confirmée pour plusieurs marqueurs *mal⁻* d'efficacité très variable (57). Ce résultat a été également obtenu par SHOCKLEY (cité dans HOTCHKISS et GABOR, (52) pour des marqueurs de résistance à la pénicilline.

*f) Mécanisme responsable de la faible efficacité des marqueurs LE :
hypothèses*

Tous les faits que nous venons de voir en relation avec les efficacités des marqueurs, restreignent le nombre d'hypothèses permettant de les comprendre. LACKS, (58) en 1966, a proposé une hypothèse de travail que lui-même a rejeté quelques années plus tard (59). Actuellement, au moins deux théories, différentes dans leur principe, sont susceptibles d'expliquer ces résultats.

La première, due à EPHRUSSI-TAYLOR (25) fait intervenir un système de correction par excision et synthèse réparatrice. Lorsque, au cours de la transformation, l'appariement entre le brin transformant et le brin récepteur est non permissif au niveau de la mutation, un processus de correction excise un des deux brins à ce niveau, puis en synthétise un nouveau en se servant du brin complémentaire comme matrice. Le brin exogène est éliminé préférentiellement au brin endogène (environ neuf fois sur dix). L'hétéroduplex formé avec un marqueur HE, correspondant à une confrontation permissive, n'est pas sujet à excision. L'excision est extensive, ce qui provoque l'exclusion des mutations HE par une mutation LE.

La deuxième hypothèse possible (FOX, communication personnelle) fait intervenir la duplication du DNA. Elle est basée sur l'existence d'une enzyme qui éliminerait spécifiquement le chromosome porteur d'un hétéroduplex non permissif (mutation LE) par cassure des deux brins au niveau de la mauvaise confrontation. Cette enzyme n'interviendrait pas dans le cas des confrontations permissives des marqueurs HE. Mais si l'intégration du brin transformant porteur d'un marqueur LE se produit juste avant la fourche de duplication, celle-ci rendra la région homozygote avant que cette enzyme puisse intervenir. Comme la compétence est un état qui s'établit rapidement, on peut penser que, quelle que soit la position du marqueur sur le chromosome, un dixième des cellules compétentes renferme un point de duplication précédant le locus du marqueur considéré. L'intégration des marqueurs à forte efficacité peut se faire quelle que soit la position de la fourche de duplication. Mais, si le brin transformant porte un marqueur LE associé à un marqueur HE, ce dernier ne donnera une bactérie transformée, en dehors du point de duplication, que si les deux mutations sont dissociées par recombinaison. L'exclusion du marqueur HE sera d'autant plus grande que les deux marqueurs seront liés.

En conclusion, d'après les principaux résultats acquis sur l'action des

mécanismes de recombinaison au cours de la transformation bactérienne, nous pouvons dire que les événements moléculaires subis par les DNA recombinants sont maintenant relativement bien connus.

Le travail que nous présentons ici a été consacré à l'étude du mécanisme qui est responsable de l'efficacité des marqueurs. Nous pensons que la compréhension de ce mécanisme en particulier doit faire avancer nos connaissances sur les mécanismes plus généraux de la recombinaison génétique.

EXPOSE DES RECHERCHES

Dans la première partie de ce travail nous décrirons l'isolement de différents mutants par une méthode de transformation sur boîtes spécialement adaptée au pneumocoque (chapitre I) et nous exposerons les propriétés d'une souche non discriminante, rendue isogénique avec une souche discriminante standard par la méthode de transformation sur boîtes. Dans la deuxième partie nous analyserons plusieurs caractéristiques nouvelles du processus de discrimination : l'existence de quatre classes distinctes d'efficacité pour les mutations spontanées au locus *ami A* (chapitre III), l'action du processus de discrimination sur la mutagénèse spontanée (chapitre IV), la saturation de ce processus par un DNA transformant non isogénique avec le DNA récepteur (chapitre V), l'absence de relation entre le processus de discrimination responsable de l'effet marqueur et la discrimination contre du DNA de streptocoque et enfin la spécificité du mécanisme de discrimination en relation avec la nature des paires de bases mal appariées (chapitre VI). Dans la troisième partie nous rechercherons quelle est la nature de ce mécanisme responsable de l'effet marqueur. Nous éliminerons la possibilité de l'intervention de la fourche de duplication pour l'intégration des marqueurs LE (chapitre VII) et nous apporterons des arguments en faveur de l'hypothèse de l'action d'un système de correction par excision et synthèse réparatrice pour les marqueurs LE (chapitre VIII). Les raisons pour lesquelles la perte du système de réparation par excision ou par recombinaison des lésions provoquées par le rayonnement ultraviolet sur le DNA, n'influe pas sur les efficacités des marqueurs, seront discutées dans le chapitre IX. Dans une quatrième partie nous présenterons les résultats préliminaires sur les travaux entrepris pour isoler le ou les endonucléases spécifiques des DNA renfermant certaines paires de bases mal appariées (chapitre X). Enfin dans la dernière partie nous rechercherons si l'effet marqueur observé dans la transformation du pneumocoque existe aussi chez les principales espèces bactériennes transformables (chapitre XI).

1ère PARTIE

ISOLEMENT ET ETUDE D'UN MUTANT AFFECTANT LE SYSTEME DE DISCRIMINATION

CHAPITRE I

ISOLEMENT DE MUTANTS ALTERES DANS LEUR TRANSFORMABILITE
OU DANS LEUR POUVOIR DE DISCRIMINATION

La transformation bactérienne exige plusieurs étapes, qui commencent par la fixation du DNA libre par les cellules compétentes et qui finissent par l'altération du génome récepteur. En terme d'événements biochimiques, seules quelques étapes déterminant le sort du DNA après la pénétration sont caractérisées chez *Diplococcus pneumoniae*. La nature des changements physiologiques qui se produisent pendant le développement de la compétence est pratiquement inconnue. La nature du mécanisme capable de faire une discrimination entre divers marqueurs dans la transformation du pneumocoque est aussi mal connue. Comme nous l'avons déjà vu, les marqueurs d'auxotrophie ou ceux déterminant la résistance à un antibiotique ont été divisés en plusieurs classes selon leur efficacité individuelle. Nous ne considérons ici que les deux catégories de marqueurs les plus fréquentes que sont les marqueurs à forte efficacité (HE) et les marqueurs à faible efficacité (LE). Les résultats de plusieurs auteurs suggèrent que le mécanisme d'intégration des marqueurs LE pourrait être différent de celui des marqueurs HE (57-68-70). Dans ce cas il devrait être possible d'isoler des souches mutantes dont l'intégration soit des marqueurs LE soit des marqueurs HE serait affectée. Dans le but d'isoler de tels mutants nous avons mis au point une technique de transformation sur boîte spécialement adapté au pneumocoque. Cette méthode s'est avérée efficace pour isoler des mutants altérés dans le système de discrimination, mais aussi des mutants déficients dans d'autres étapes de la transformation.

MATERIELS ET METHODES

Souches : La souche parentale de *Diplococcus pneumoniae* appelé "clone 3" (Cl₃) est utilisée comme souche réceptrice dans les expériences de transformation. Le DNA donateur est isolé à partir de la souche 69 (appendice I, 114). Cette souche porte deux marqueurs HE, l'un conférant la résistance à 2000 µg/ml de streptomycine : *str-r* 41 (48), l'autre à 0,1 µg/ml d'érythromycine : *ery-r* 6 (41) ainsi que deux mutations LE, la première conférant la résistance à 2×10^{-5} M d'aminoptérine : *ami* A-r9 (103) et l'autre à 5 µg/ml d'optochine : *opt-r* 2 (24).

Le marqueur thymidine (*thy* A2) d'une souche de pneumocoque exigeant la thymidine (35) fournie généreusement par RAVIN a été introduit par transformation dans la souche sauvage Cl₃ (10). A partir de la souche Cl₃Td⁻ qui exige 60 µg/ml de thymidine pour sa croissance, nous avons isolé une souche n'exigeant plus que

5 $\mu\text{g/ml}$ de thymidine. Cette dernière souche Cl_3Td^- , exigeant 5 $\mu\text{g/ml}$ de thymidine et portant le marqueur *str-r* 41 est utilisée pour la préparation du DNA marqué par la thymidine tritiée.

Milieux : Les milieux utilisés pour la croissance du pneumocoque et pour la transformation en liquide ont été décrits dans une publication antérieure (103). Le milieu spécial pour la transformation en solide est préparé de la façon suivante : 7,5 g de Neopeptone Difco, 7,5 g de Casamino acid Difco et 13 g de NaCl sont dissouts dans 1,5 litres d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,8 avec de la soude et l'épais précipité qui apparaît est enlevé par filtration. Le milieu filtré est distribué en fraction de 125 ml par flacon auquel on ajoute 3 g de gélose. Les flacons sont stérilisés à 120° et gardés à la température ambiante. Avant son utilisation, ce milieu de base est fondu, refroidi à 55° , puis on ajoute au contenu de chaque flacon 0,3 ml d'une solution de glucose à 25 % et 50 ml du milieu préparé de la façon suivante : 36 g de Yeast Extract Difco sont dissouts dans 330 ml d'eau distillée, le pH est ajusté à 3 avec HCl 4N ; 15 g de charbon (Billaut Charbon animal 15 % cendres) sont ajoutés et le mélange est agité vigoureusement. Après 2 heures d'absorption à 4° le charbon est éliminé par filtration dans un entonnoir Buchner contenant un papier filtre (Whatman # 3) recouvert d'une mince couche de cellite (Touzart et Matignon). Le pH de la solution est alors ajusté à 7,8 avec de la soude 10 N et l'épais précipité est enlevé par filtration comme précédemment. Puis 7,5 mg d'asparagine, 100 mg de glutamine et 3 g de la fraction V de l'albumine sont ajoutés. Le volume est amené à 600 ml avec de l'eau distillée et le milieu est stérilisé par filtration à travers une membrane filtrante. Ce milieu est gardé congelé.

Préparation du DNA de pneumocoque marqué au ^3H : Les cellules de la souche $\text{Cl}_3 \text{str-r } 41 \text{ dt}^-$ exigeant 5 $\mu\text{g/ml}$ de thymidine sont mises à pousser jusqu'à une concentration de 2×10^8 centres formateurs de colonies (c. f. c.)/ml dans 10 ml de milieu P complet (III) contenant 500 μCi de $(\text{Me} - ^3\text{H})$ thymidine (Ci/mM, C. E. A. Saclay). Les cellules sont centrifugées, lavées et remises en suspension dans 2 ml de la solution 0,15 M-NaCl, 0,015 M-EDTA, 0,1 % désoxycholate. Après la lyse des cellules, les acides nucléiques sont précipités avec un volume d'alcool à 95° . Les fibres d'acides nucléiques sont retirées avec une pipette Pasteur et sont introduites dans 4 ml de SSC dilué au dixième (0,015M NaCl, 0,0015 M citrate de sodium). Le tube est alors agité jusqu'à dissolution complète des fibres d'acides nucléiques.

Méthode de transformation en milieu liquide : Les techniques de base de transformation en liquide ont été publiées antérieurement (103). Dans certaines expériences, la compétence des cellules a été induite artificiellement par l'activateur décrit par TOMASZ et HOTCHKISS (125). Les préparations non purifiées

d'activateur sont obtenues par la méthode de TOMASZ et MOSER (126) modifié par VOVIS et BUTTIN (129). Les cellules compétentes (1 ml) sont mises en contact avec une solution de DNA transformant (0,1 µg/ml) pendant 15 minutes à 37°. La suspension bactérienne est étalée dans un milieu non sélectif pour une expression de phénotype complète. Après 2 1/2 heures d'incubation à 37° une deuxième couche de gélose nutritive contenant l'antibiotique est versée sur le contenu des boîtes. Le nombre de colonies résistantes est déterminé après une nuit d'incubation.

Mesure de la quantité de DNA absorbé par les cellules : Des cultures de 2 ml à leur maximum de compétence sont préparées par la méthode utilisant l'activateur. Le DNA de pneumocoque marqué au tritium est ajouté à chaque culture à la concentration finale de 0,25 µg/ml. Après 20 minutes d'incubation à 37°, de la désoxyribonucléase pancréatique (Worthington) est ajoutée (10 µg/ml) et l'incubation est continuée pendant 2 minutes supplémentaires. Un prélèvement est effectué afin de déterminer le nombre de bactéries transformées pour la résistance à la streptomycine. Chaque complexe bactérie-DNA radioactif est refroidi dans un bain glacé pendant 2 minutes, lavé 3 fois par centrifugation et remis en suspension dans le milieu minéral du milieu synthétique (103). Le dernier culôt de centrifugation est repris dans 1 ml d'acide trichloroacétique à 10 % et chauffé dans l'eau bouillante pendant 30 minutes. Après refroidissement, les protéines sont séparées par centrifugation, et une fraction du surnageant est ajoutée à 10 ml de solution de Bray et la radioactivité est comptée dans un spectromètre à scintillation liquide (Nuclear Chicago).

Mutagenèse : Un des agents mutagènes les plus actifs chez les bactéries est utilisé : la 1 méthyle -3- nitro - 1 - nitrosoguanidine (NG). La méthode utilisée pour obtenir des mutants est la suivante : un volume de 1 ml de culture de Cl_3 est prélevé 20 minutes après le pic de compétence et traité avec 50 ou 75 µg de NG pendant 30 minutes à 37°. Après centrifugation et lavage, la culture est diluée 500 fois dans le milieu de croissance, et des fractions de 1 ml sont distribuées dans 10 petits tubes. Après 8 heures de croissance à 37°, du glycérol est ajouté aux cellules (12 %). Le nombre de bactéries *ami-r* et *opt-r* est alors déterminé à partir de deux tubes. Dans ces conditions les fréquences de mutants résistants à l'aninoptérine (2×10^{-5} M/ml), optochine 5 µg/ml érythromycine (0,1 µg/ml) ou la streptomycine (150 µg/ml) sont dans l'ordre, 2×10^{-2} ; 1×10^{-4} ; $2,5 \times 10^{-5}$ et 1×10^{-5} .

Irradiation des cellules à la lumière ultraviolette : Les cellules en phase exponentielle de croissance dans le milieu peptoné complet sont centrifugées, lavées une fois puis remises en suspension dans le milieu minéral du milieu minimum établi par SICARD (103), à une concentration cellulaire finale d'environ

10^7 c. f. c/ml. Deux ml de suspension cellulaire sont introduits dans une boîte de pétri de 5 cm de diamètre et irradiés immédiatement avec une lampe germicide (General Electric) à une dose d'environ 14 erg/mm^2 par seconde. Des échantillons sont retirés à différents moments et après dilution sont étalées en milieu gélosé. Toutes ces opérations sont effectuées dans l'obscurité afin d'éviter une éventuelle photo-réactivation.

RESULTATS

METHODE POUR OBTENIR LA TRANSFORMATION EN MILIEU SOLIDE .

Les bactéries d'une culture de Cl_3 diluée de façon à obtenir 100 à 150 colonies par boîte, sont étalées sur la surface d'une boîte de pétri contenant 10 ml de milieu pour transformation en milieu solide. Après 18 heures d'incubation à 37° , une seconde couche, mince, de 3 ml de milieu de transformation gélosé (0,80 %) et contenant une quantité saturante de DNA est lentement versée sur la surface des boîtes. Après 6 heures d'incubation pour permettre à la transformation d'avoir lieu, une autre couche de 10 ml de milieu riche contenant 1,5 % de gélose, 1 % de sang de cheval et l'agent sélectif est versée avec précaution sur la deuxième couche. Après 48 heures d'incubation à 37° les colonies contenant les bactéries transformées, résistantes à l'agent sélectif peuvent facilement être identifiées par leur plus large taille et par le changement de couleur du sang autour de la colonie.

Cette méthode pour détecter des cellules transformées sur la boîte est préférable à une méthode de répliques, puisque les colonies de pneumocoques sont très petites et les transformées ne peuvent pas être prélevées efficacement par le velours.

La transformation la meilleure est obtenue lorsque le pH du milieu est compris entre 7,8 et 8. L'albumine est absolument nécessaire mais le sang de cheval qui probablement contient des nucléases, doit être ajouté seulement après l'achèvement de la transformation. Dans ces conditions, 100 % des colonies mises en contact avec le DNA porteur des mutations *str-r 41* (HE) et *opt-r 2* (LE) se développe en présence de streptomycine et 90 à 100 % des colonies se développe en présence d'optochine. En absence de DNA aucune croissance n'est observée dans les boîtes avec la streptomycine, tandis qu'environ 2 % des colonies augmente de taille dans les boîtes avec l'optochine.

METHODE POUR L'ISOLEMENT DE MUTANTS DONT LA RECOMBINAISON EST MODIFIEE.

Après une mutagénèse, une culture de cellules sauvages peut contenir des cellules modifiées dans leur transformabilité. La méthode retenue pour détecter ces mutants est basée sur les changements dans les fréquences des bactéries transfor-

mées pour un seul ou deux marqueurs après transformation de cellules individuelles par du DNA porteur de mutations indépendantes. Si, par exemple, la fréquence de cellules transformées dans une colonie est 10^{-2} pour les marqueurs à forte efficacité tel que *str-r 41* et *ery-r 6* et 10^{-3} pour des marqueurs à faible efficacité comme *opt-r 2* et *ami A-r 9*, la fréquence de cellules doublement transformées sera 10^{-4} pour la paire *str-r ery-r* et seulement 10^{-6} pour la paire *opt-r ami A-r*. Cette dernière fréquence est si faible qu'une colonie donnera rarement des cellules doublement transformées pour deux marqueurs LE indépendants après transformation sur boîte. Par contre un mutant qui intègre tous les marqueurs avec une forte efficacité produira des cellules doublement transformées même dans le cas du couple *opt-r ami A-r*.

La méthode expérimentale utilisée est indiquée dans la figure 1. Les boîtes mères sont préparées à partir d'une culture de Cl_3 traitée avec la nitrosoguanidine. Les suspensions des cellules mutagénisées sont diluées et étalées. Après 24 heures d'incubation à 37° deux séries de répliques sont faites à partir de chacune des boîtes mères, sur des boîtes contenant le milieu pour transformation en solide. Puis avant toute incubation additionnelle, le DNA de la souche 69 portant deux marqueurs HE (*str-r 41* et *ery-r 6*) et deux marqueurs LE (*ami A-r 9* et *opt-r 2*) est ajouté aux boîtes dans une seconde couche de 3 ml de milieu de transformation contenant 0,8 % de gélose. Les étapes suivantes de la méthode sont les mêmes que celles décrites au-dessus.

Les colonies qui apparaissent comme modifiées dans leur transformabilité sont prélevées sur les boîtes sans antibiotiques et des cultures sont préparées. Chaque culture est rendue compétente par l'activateur et transformée par le DNA de la souche 69 pour vérifier les résultats obtenus sur les boîtes.

Le tableau 1 résume le comportement attendu de quelques mutants déficients pour la transformation ou dont la recombinaison est modifiée.

ISOLEMENT DE MUTANTS.

Une grande variété de mutants a été obtenue par la méthode que nous venons de décrire.

A - Mutants modifiés dans leur pouvoir de transformation.

Environ 1 à 2 % des colonies obtenues à partir d'une culture traitée avec la NG sont incapables de donner des transformées optochine et streptomycine. Une trentaine de mutants qui ne transforment plus (classe 1) ou qui transforment très peu pour les marqueurs HE et LE (classe 2) sont isolés à partir de cinq échantillons de la même mutagénèse. Dans un premier essai de classification de ces mutants nous avons déterminé leur sensibilité à la lumière ultraviolette. La figure 2 représente la cinétique d'inactivation des clones les plus représentatifs. D'après leur réponse aux UV, trois groupes peuvent être distingués : la souche 358 et la souche

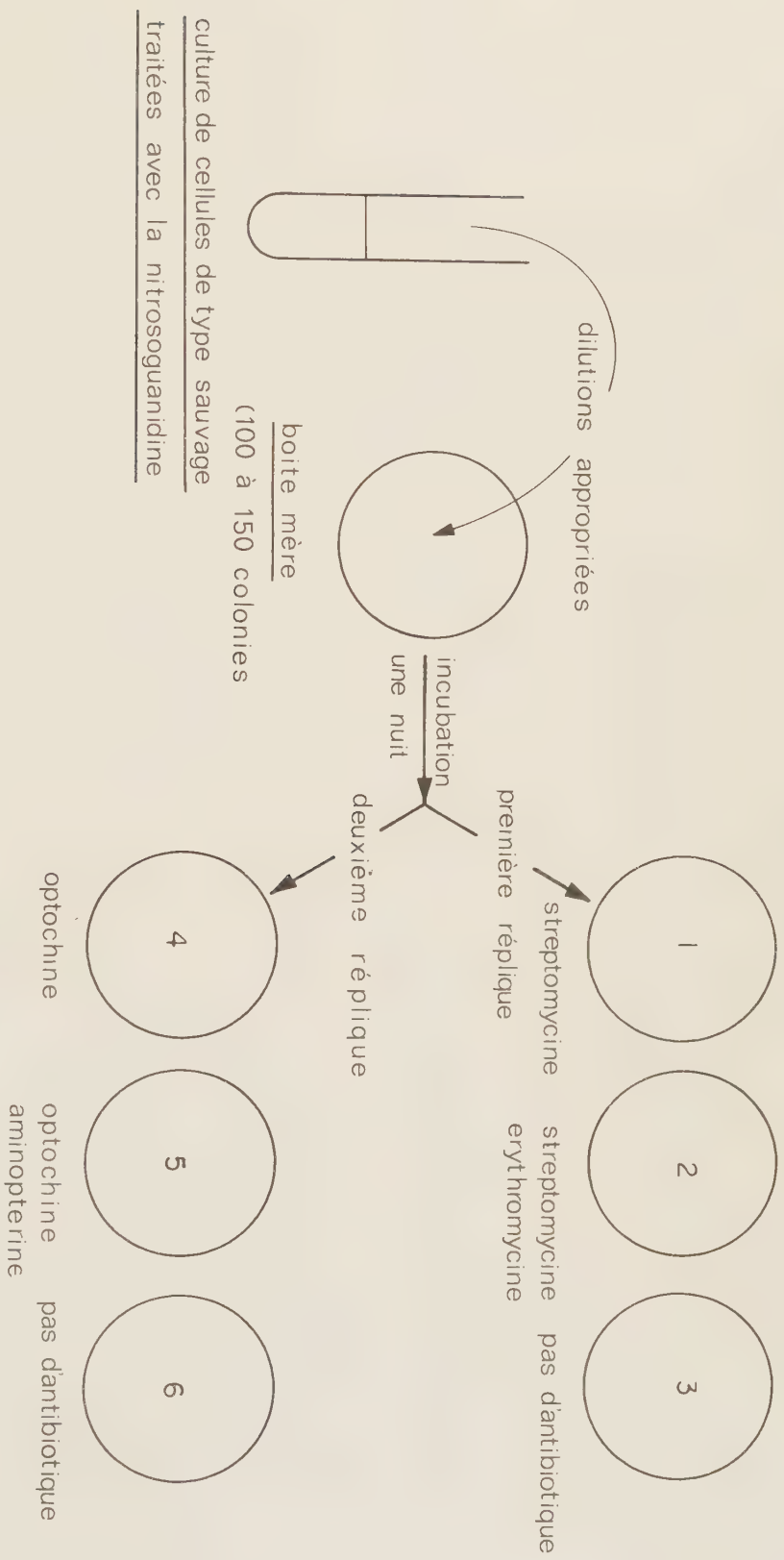


Figure 1 - METHODE EXPERIMENTALE POUR L'ISOLEMENT DE MUTANTS DE *DIPLOCO-*

CCUS PNEUMONIAE ALTERES DANS LA TRANSFORMATION ET LA RECOMBINAISON.

Le DNA transformant de la souche 69 portant les marqueurs *str^r-r⁴¹*, *ery^r-r⁶*, *ami^r A-r⁹*, *opt-r²*, est ajouté dans une deuxième couche immédiatement après la fin de la réplique sur les six boîtes. La combinaison des antibiotiques cités dans la figure est fournie, 6 heures plus tard, dans une troisième couche.

TABLEAU 1

*COMPORTEMENT THEORIQUE DE MUTANTS ALTERES DANS LA TRANSFORMATION
OU DANS LA RECOMBINAISON APRES TRANSFORMATION SUR BOITES*

Nature du clone sur la boîte mère	Numéro de la boîte						Classe des mutants
	1	2	3	4	5	6	
Cellules sauvages	+	+	+	+	-	+	
Mutants non-transformables	-	-	+	-	-	+	1
Mutants peu transformables	+	-	+	-	-	+	2
Mutants intégrant tous les marqueurs avec une forte efficacité	+	+	+	+	+	+	3
Mutants intégrant tous les marqueurs avec une faible efficacité	+	-	+	+	-	+	4
Mutants n'intégrant plus les mar- queurs à forte efficacité	-	-	+	+	-	+	5
Mutants n'intégrant plus les mar- queurs à faible efficacité	+	+	+	-	-	+	6

Le numéro des boîtes sont ceux indiqués dans la figure 1. (+) signifie que la colonie se développe jusqu'à une grande taille (voir le texte) ; (-) signifie que la colonie ne se développe pas.

356 sont 2,5 et 2 fois plus résistants que la souche sauvage ; la souche 354 a la même sensibilité que la souche sauvage ; les souches 355 et 405 sont plus sensibles que Cl_3 . Afin de rechercher quelle est la nature des étapes bloquées nous avons fait une mesure d'incorporation du DNA radioactif pour les mutants déficients dans la transformation. Les résultats de ces expériences sont présentés dans le tableau 2.

On peut remarquer que le DNA ne pénètre pas dans les souches 354, 355 et 358 dans les conditions de très bonne transformabilité de la souche sauvage. Les efficacités relatives d'intégration des divers marqueurs sont les mêmes dans les souches 405 et Cl_3 (III). La diminution du nombre de transformées dans la souche 405 est partiellement due à une diminution de l'intégration du DNA transformant dans le génome des cellules, puisque le nombre de transformées par coup de radioactivité incorporée est cinq fois moins élevé dans 405 que dans Cl_3 .

B - Mutants modifiés dans leur pouvoir de recombinaison.

Les mutants d'une grande importance pour étudier la recombinaison chez le pneumocoque sont ceux qui modifieraient l'efficacité d'intégration des marqueurs HE ou des marqueurs LE par comparaison à la souche discriminante standard. Quelques mutants de ce type, dont la recombinaison est modifiée sont isolés par la méthode de transformation sur boîtes.

Dans la souche 500 la variation de l'efficacité d'intégration pour plusieurs marqueurs est moins prononcée que dans Cl_3 (Tableau 3).

La mesure du DNA fixé par les cellules suggère que ce sont surtout les efficacités des marqueurs HE qui sont modifiées dans cette souche (Tableau 4).

Les efficacités des marqueurs LE sont presque les mêmes que dans la souche sauvage, mais l'efficacité du marqueur *str-r 41* semble abaissée. Les données du tableau 3 impliquent que l'autre marqueur testé, *ami A r 1*, se comporte comme *str-r 41*, puisque les efficacités de ces deux marqueurs sont les mêmes dans la souche 500. Définie seulement par son comportement au cours de la transformation sur boîtes, la souche 500 se range dans le groupe 4 (Tableau 1).

Les mutants T6 et T16 représentent une autre classe de mutants dont la recombinaison est modifiée. Dans ces souches les différences dans les efficacités entre les marqueurs HE et LE sont amplifiées par comparaison à la souche sauvage (tableau 3). En outre, pour les marqueurs LE le délai dans l'expression complète du phénotype est très augmenté dans T6 et T16, alors que ce délai est normal pour les marqueurs à forte efficacité *str-r 41* et *ami-A r 1*. Probablement parce que les marqueurs LE ne sont pas entièrement exprimés au moment de la sélection dans la transformation sur boîtes, les souches T6 et T16 se comportent, par cette méthode, comme des mutants de la classe 6 (tableau 1).

Les mutants de la classe 3 (tableau 1) chez lesquels les efficacités des marqueurs LE augmentent jusqu'au niveau de l'efficacité des marqueurs HE, sont connus. De tels mutants ont été isolés, par hasard, au cours des quinze dernières

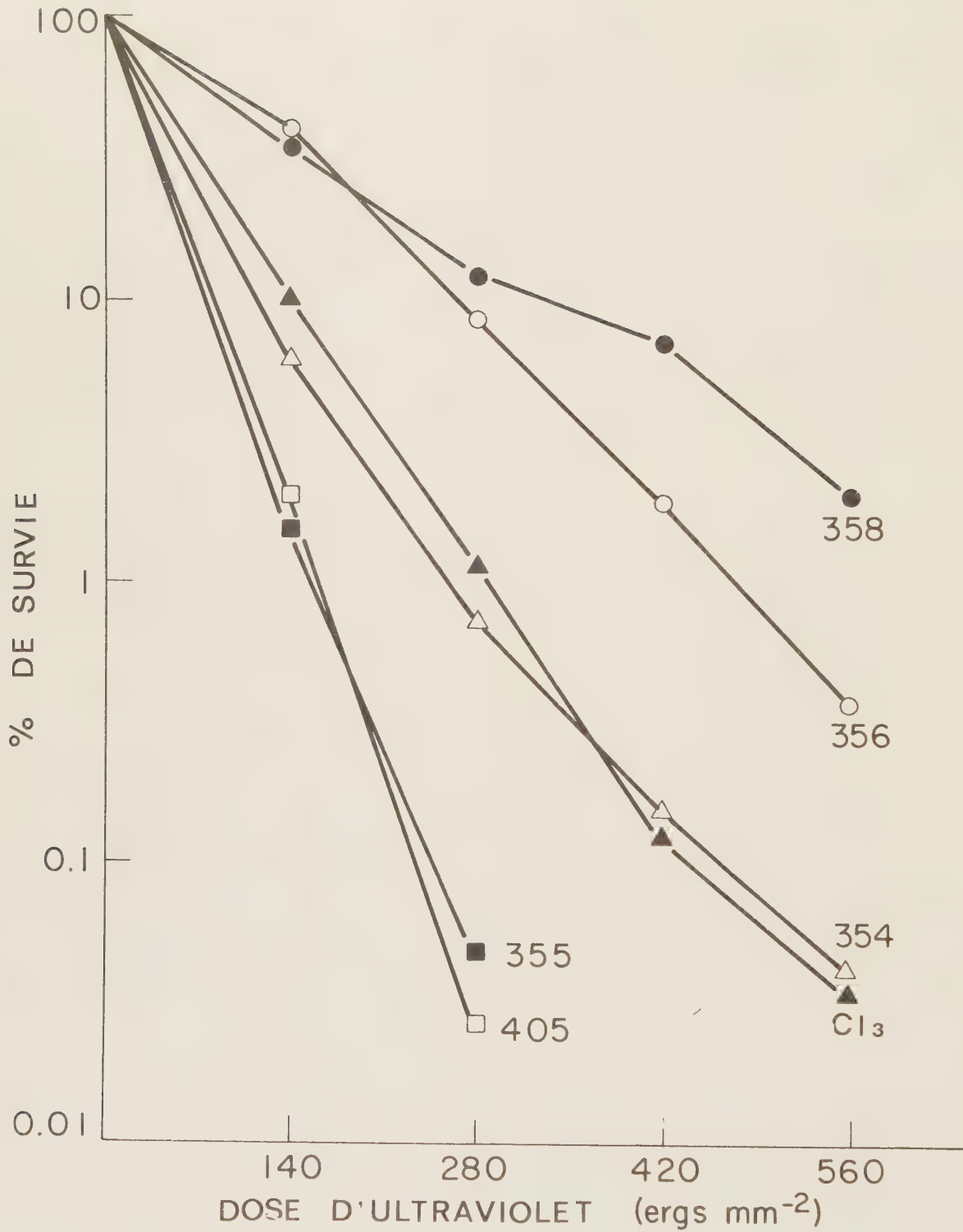


Figure 2 - SENSIBILITE A LA LUMIERE ULTRAVIOLETTE DE MUTANTS DE *DIPLOCOCCUS PNEUMONIAE* ALTERES DANS LA TRANSFORMATION. Ces mutants sont isolés par la méthode de transformation en milieu solide. L'irradiation est effectuée selon la méthode décrite dans la section de "MATERIELS ET METHODES".

TABLEAU 2

FIXATION IRREVERSIBLE DU DNA PAR DES SOUCHES ALTEREES DANS LEUR TRANSFORMABILITE

souche	Transformées streptomycine par ml (str-r)	Coups/min/ml (cpm)	str-r/cpm
354	< 20	80	-
355	< 20	124	-
358	< 20	112	-
405	2,1 x 10 ⁵	4 950	42
Cl ₃	2,43x 10 ⁶	10 370	230
Cl ₃ non compétent	< 20	90	-

Une culture rendue compétente par l'activateur contenant 7×10^7 centres formateurs de colonies /ml est mise en contact avec du DNA tritié portant le marqueur str-r. Les mesures sont effectuées selon la méthode décrite dans la section MATERIELS et METHODES. Les cellules non compétentes de Cl₃, comme contrôle, sont obtenues en abaissant le pH du milieu de transformation.

TABLEAU 3

EFFICACITES RELATIVES D'INTEGRATION DE DIVERS MARQUEURS DANS DES MUTANTS ALTERES
DANS LA RECOMBINAISON ET DANS LA SOUCHE SAUVAGE

Marqueurs	Souches			
	Cl ₃	500	T6	401
ami A-r1	1,2 ± 0,1	1,09 ± 0,1	1,2	0,82 ± 0,03
ami A-r9	0,15 ± 0,05	0,46 ± 0,05	0,05	0,82 ± 0,03
opt-r2	0,18 ± 0,05	0,39 ± 0,06	0,05	0,48 ± 0,04
str-r41	1,00	1,00	1,00	1,00

L'efficacité d'intégration d'un marqueur donné est déterminée par le rapport du nombre de transformées pour ce marqueur au nombre de transformées pour le marqueur de référence conférant la résistance à la streptomycine : str-r41. Les différentes souches sont transformées par le DNA de la souche 69 et par le DNA portant les deux marqueurs str-r41 et ami A-r1. Les cellules compétentes sont mises en contact avec le DNA pendant 20 minutes, puis les suspensions de cellules sont étalées dans un milieu non sélectif. Après 150 minutes d'incubation à 37° pour les souches Cl₃, 500, 401, et 300 minutes d'incubation pour la souche T6, les transformées sont sélectionnées par l'addition d'une deuxième couche de milieu contenant l'antibiotique.

TABEAU 4

PENETRATION DU DNA ET EFFICACITE DE TRANSFORMATION DANS LA SOUCHE Cl_3 (SAUVAGE)
ET 500 (RECOMBINATION ALTEREE)

Souches	Concentration de DNA ($\mu\text{g/ml}$)	Coups/min/ml de culture (cpm)	Nombre de transformées par ml de culture		Str-r/cpm	Opt-r/cpm
			Streptomycine $\times 10^4$	Optochine $\times 10^3$		
Cl_3	0,25	14 930	313	563		
	0,25	10 370	243	437	1,00	1,00
	0,05	2 510	57	103		
500	0,25	17 500	87,5	341		
	0,25	9 850	74,5	291	0,31	0,67
	0,05	2 820	23	90		

Les mesures sont effectuées selon la méthode décrite dans la section MATERIELS et METHODES. Les valeurs de Str-r/cpm et Opt-r/cpm sont les moyennes des valeurs obtenues avec les trois différentes expériences rapportées dans ce tableau.

années ; ce sont la souche *Rx* (93) la souche 84 (61 - 81), et plus récemment, les souches *Hex*⁻ (59). LACKS (59) a déduit de ces expériences qu'une seule mutation, bien spécifique, dans la souche réceptrice était responsable de l'augmentation de l'efficacité d'intégration de tous les marqueurs LE. Nous avons également isolé un mutant de ce type, la souche 401, qui donne une différence réduite dans les efficacités des divers marqueurs (71 - III -). Les propriétés de ce mutant sont décrites dans le prochain chapitre. Grâce à la mesure du DNA marqué par des isotopes radioactifs, fixé par les cellules compétentes, nous avons montré que la souche 401 augmentait surtout l'efficacité des marqueurs LE. De plus, 401 et aussi *Rx* (FOX, communication personnelle) et *Hex-1* (59) ont le même niveau de résistance à la lumière ultraviolette que la souche sauvage, tandis que la mutation qui modifie les efficacités des marqueurs dans la souche 500 semble conférer en plus la sensibilité aux radiations ionisantes (III).

La méthode de transformation sur boîtes a été utilisée pour introduire le gène responsable du phénotype 401 dans la souche sauvage. La méthode expérimentale est la suivante : les cellules compétentes de *Cl₃* sont mises en contact avec le DNA de la souche 401, et après une dilution au dixième, les cellules sont incubées pendant 3 heures à 37° pour permettre la ségrégation du phénotype mutant. Ces cellules sont examinées pour leur transformabilité sur boîtes selon la méthode décrite plus haut et sont sélectionnées pour les doubles transformées LE-LE résistantes à l'aminoptérine et à l'optochine. Seulement six colonies se sont développées en présence des deux antimétabolites. Des examens ultérieurs ont montré que deux de ces colonies possédaient le phénotype de la souche donatrice 401.

DISCUSSION

La méthode de transformation sur boîte de pétri rapportée ici et spécialement adaptée à *Diplococcus pneumoniae*, fournit un moyen pour isoler à la fois des mutants déficients dans la transformation et des mutants dont la recombinaison est modifiée. Les mutants dont la recombinaison est modifiée sont ceux dans lesquels le mode d'intégration de seulement une classe de marqueurs est altéré par comparaison avec la souche sauvage.

La première catégorie de mutants isolés comprend ceux qui ne sont pas transformables ou sont peu transformables par deux méthodes différentes de transformation : celle que nous utilisons depuis plusieurs années dans le laboratoire (103) et celle plus récente qui nécessite l'utilisation de l'activateur de compétence. CASTER, POSTEL et GOODGAL (II) ont isolé des mutants de *Haemophilus influenzae* déficients pour la transformation, par une méthode de transformation sur boîtes. Ces mutants ont été divisés en quatre classes d'après leur capacité de fixer et d'être transformés par du DNA natif et dénaturé. Le pneumocoque étant très faiblement transformable par du DNA dénaturé, nous n'avons pu classer nos mutants non

transformables de pneumocoque d'après le même critère utilisé par CASTEL, POSTEL et GOODGAL (II). Une étude préliminaire de ces mutants de pneumocoque a révélé une grande variété dans cette catégorie. Selon leur sensibilité aux UV, plusieurs classes peuvent être distinguées. Il en découle que les modifications génétiques de transformabilité ne sont pas nécessairement associées à un changement dans la sensibilité à la lumière ultraviolette.

L'augmentation de la résistance aux UV des bactéries non-transformables qui ne peuvent fixer le DNA est inattendue. Il est possible que ces bactéries soient mutées pour un gène conférant la résistance aux UV et un autre gène contrôlant la transformabilité. Cependant, nous avons isolé deux autres mutants spontanés pour leur résistance aux UV (III) ; ils sont aussi non-transformables. Ainsi il se pourrait que ces deux propriétés soient contrôlées par un seul gène.

Certains mutants non-transformables qui montrent la même sensibilité UV que la souche sauvage sont probablement défectifs dans les premières étapes de la pénétration du DNA. Ces étapes nécessitent plusieurs protéines puisque plusieurs protéines non détectables (tel l'activateur) dans les cellules non-compétentes, sont trouvées dans les cellules compétentes (124 - 127).

Les études sur l'état physiologique de la compétence chez le streptocoque, organisme apparenté au pneumocoque, sont facilitées par l'existence de populations naturelles de streptocoques de groupe H, déficientes dans leur capacité à subir la transformation. PAKULA, SPENCER et GOLDSTEIN (86) ont montré que, soit le facteur de compétence (activateur), soit un facteur inactivant le DNA donateur, soit les deux facteurs ensemble étaient absents dans ces souches naturelles non-transformables. Pour cette raison, des mutants de pneumocoques non-transformables ou faiblement transformables pourraient être d'une grande utilité pour résoudre le problème du mode de transport du DNA dans les cellules compétentes.

Un des mutants sensibles aux UV (souche 405) est en partie déficient pour la recombinaison. Quelques propriétés de cette souche (III, chapitre 9) sont similaires à celles du mutant de recombinaison A5 - 5 - 9 A isolé par VOVIS et BUTTIN (129).

La seconde catégorie de mutants comprend les souches qui modifient les efficacités d'intégration des marqueurs. L'étude de ces mutants devrait fournir de nouveaux éclaircissements sur le mécanisme responsable des efficacités des marqueurs. Dans le chapitre qui suit nous présenterons le résultat d'une étude entreprise avec une souche non discriminante, la souche 401,

CHAPITRE II

ETUDE D'UN MUTANT DEPOURVU DE POUVOIR DE DISCRIMINATION

La capacité du pneumocoque à discriminer entre les divers marqueurs au cours de la transformation peut être perdue par mutation. Des souches mutantes qui ne font plus de discrimination entre les marqueurs LE et HE ont été identifiées parmi les stocks de culture déjà existants ou après mutagénèse (59 - 64 - 93). Nous avons également isolé un tel mutant (souche 401), qui intègre les marqueurs LE et les marqueurs HE avec environ la même efficacité (chapitre I). Nous avons introduit la mutation responsable de ce phénotype dans la souche standard Cl₃.

Afin de faciliter la compréhension des différentes publications traitant de l'effet marqueur chez le pneumocoque, une désignation des deux types de souches, maintenant admise par tous les laboratoires intéressés, a été établie. Les souches de pneumocoques qui montrent l'effet marqueur sont dites *souches discriminantes* et ont le phénotype *hex*⁺, alors que les souches qui intègrent tous les marqueurs avec la même efficacité sont dites *souches non discriminantes* et ont le phénotype *hex*⁻ (pour high efficiency x, Lacks, communication personnelle). D'autre part, le mécanisme qui est responsable des différences dans les efficacités d'intégration des marqueurs, est appelé, indifféremment, soit le processus de discrimination soit la fonction hex.

Dans ce chapitre nous présentons les résultats d'une étude comparative des propriétés de chacune des deux souches isogéniques Cl₃ et 401. Les données obtenues suggèrent que dans le mutant, le produit d'intégration de tous les marqueurs est celui caractéristique des marqueurs à forte efficacité.

MATERIELS ET METHODES

Souches : La souche sauvage standard de *Diplococcus pneumoniae* Cl₃ est utilisée comme réceptrice dans les expériences de transformation. Les souches résistantes aux antibiotiques sont construites par transformation des marqueurs appropriés dans Cl₃. En plus de la souche 69 (chapitre I, 114) la souche 39 est utilisée pour le DNA donateur. Cette dernière souche porte les marqueurs : *str-r* 41 (HE) sélectionné à 200 µg de streptomycine/ml ; *opt-r* 2 (LE) sélectionné à 5 µg d'optochine/ml ; *ami A-r* 1 (HE) sélectionné à 2×10^{-5} M d'ami-noptérine/ml ; *ery-r* 2 et *ery-r* 6, deux mutations conférant la résistance à l'érythromycine. Le double mutant *ery-r* 2, *ery-r* 6 résiste jusqu'à 4 µg/ml d'érythromycine, le simple *ery-r* 2 résiste jusqu'à 1 µg/ml et le simple *ery-r* 6 résiste jusqu'à 0,1 µg/ml.

Les milieux, la méthode de transformation et la méthode de détermination du DNA fixé ont déjà été décrits (chapitre I, 114)

Isolement de la souche 401 : En utilisant la nitrosoguanidine comme agent mutagène nous avons isolé un clone transformant le marqueur *opt-r* 2 (LE) avec la moitié de l'efficacité du marqueur *str-r* 41 (HE). Puisqu'il est probable que dans nos conditions de mutagénèse, plusieurs mutations ont été induites dans chaque cellule, le nouveau caractère a été transféré par transformation dans notre souche sauvage standard Cl₃. Outre l'efficacité d'intégration, aucune autre différence ne peut être détectée entre le mutant et la souche sauvage, incluant le temps de génération, à 25° et à 37°. Pour cribler ce caractère nous avons exploité le fait que le pneumocoque peut être transformé en milieu solide. Les cellules sauvages sont transformées par du DNA extrait de la souche mutante, et les clones montrant la même efficacité de transformation pour les marqueurs HE et LE sont sélectionnés par la méthode décrite dans le chapitre précédent. Un seul de ces clones, désigné par le nombre 401, isogénique avec Cl₃ à l'exception de la mutation sélectionnée, est retenu. La fréquence de transmission de cette mutation de la souche originale à la souche sauvage suggère qu'un seul gène est impliqué dans le phénotype 401.

Irradiation ultraviolette du DNA : Le DNA est isolé de la souche 69 selon la méthode décrite par MARTIN et EPHRUSSI-TAYLOR (76). Des échantillons de ce DNA à la concentration de 20 µg/ml sont placés dans des boîtes de pétri de 5 cm de diamètre et sont irradiés par une lampe germicide (Général Electric) à la dose de 14 ergs/mm²/sec, en maintenant une constante agitation. Après l'irradiation, les solutions de DNA sont gardées à 4° dans des tubes vissés.

Irradiation des bactéries : L'irradiation des cellules par la lumière ultraviolette est effectuée comme indiqué dans le chapitre précédent.

La source de radiations ionisantes est une machine à rayons -X SECASI opérant à 100 Kv et 30 mA. La dose n'est pas mesurée. Les cellules à irradier sont mises à pousser jusqu'à ce qu'elles atteignent une densité correspondant à 5×10^7 centres formateurs de colonies/ml. Des aliquots de 2 ml sont introduits dans une boîte de pétri et exposés sous agitation constante, aux rayons -X. Après l'exposition et avant l'étalement pour déterminer les fractions de colonies survivantes, les tubes contenant les cellules sont gardés dans un bain glacé afin de minimiser la réparation du DNA.

Préparation des complexes bactérie -DNA : Des cellules à leur maximum de compétence sont mélangées à 37° pendant 15 minutes avec une concentration de DNA transformant portant les marqueurs appropriés (103). La pénétration du DNA est arrêtée par l'addition de 5 µg/ml de désoxyribonucléase pancréatique, suivi par 2 minutes d'incubation à 37°. La culture est répartie en aliquots de 2 ml dans des petits tubes. Une fraction est réservée pour l'essai de transformation et les aliquots restants sont conservés à -70°.

Temps d'expression de phénotype et mode deségrégation des transformées

1) - Un échantillon des complexes bactérie - DNA est rapidement dégelé, dilué 10 fois dans du milieu préchauffé et incubé à 37°. Des prélèvements sont faits chaque 10 minutes à partir de la culture diluée, pendant un temps d'incubation de 120 minutes. Puis les suspensions de bactéries de chaque prélèvement, après dilution appropriée, sont étalées en milieu sélectif. Les boîtes sont incubées pendant 24 heures. Le nombre maximum de transformées est déterminé par étalement des suspensions du complexe bactérie - DNA dégelé, dans un milieu non sélectif suivie de la sélection des transformées par l'addition d'une deuxième couche contenant l'agent sélectif, après 150 minutes d'incubation à 37°.

2) - Un autre échantillon des mêmes complexes bactérie - DNA est rapidement dégelé et dilué 100 fois dans du milieu frais à 37°. Des prélèvements à partir de la culture diluée sont faits à 20 ou 30 minutes d'intervalle. Trois boîtes sont alors préparées pour chaque prélèvement et incubées à 37° immédiatement après le durcissement du milieu gélosé. Toutes les boîtes sont recouvertes au même moment avec du milieu gélosé contenant l'antibiotique appropriée, trois heures après que les premières boîtes aient été placées dans l'étuve. Les boîtes sont incubées pendant 24 heures pour permettre l'apparition de colonies visibles.

RESULTATS

EFFICACITE D'INTEGRATION DE DIVERS MARQUEURS.

La propriété de la souche 401 de transformer un marqueur LE et un marqueur HE avec approximativement la même efficacité est étendue à d'autres marqueurs. Deux marqueurs appartenant au même locus, l'un HE (*ami A-r 1*) et l'autre LE (*ami A-r 9*), possèdent la même efficacité d'intégration. L'efficacité d'intégration du marqueur *opt-r 2* n'est jamais aussi forte que celle du marqueur *str-r 41* (tableau 5).

D'autres marqueurs d'origine spontanée, conférant la résistance à 5 µg d'optochine/ml, sont isolés. Neuf marqueurs différents examinés donnent dans la souche 401 l'efficacité d'intégration caractéristique de la mutation *opt-r 2*. De même les efficacités d'intégration de 15 marqueurs *ami A* à faible efficacité dans la souche Cl₃, sont identiques dans la souche 401, les valeurs extrêmes ne dépassant pas la valeur moyenne de 0,80 de plus de 10 %.

SENSIBILITE AUX RADIATIONS.

La souche 401 possède la même sensibilité à la lumière ultraviolette que la souche sauvage (figure 3). Il semble donc que la modification introduite par la mutation 401 sur les efficacités de transformation, n'ait pas d'effet sur la sensibilité aux radiations. Afin de détecter une interaction possible entre ces pro-

TABLEAU 5

EFFICACITE RELATIVE D'INTEGRATION DE DIVERS MARQUEURS DANS LES SOUCHES 401 ET Cl₃

Souches réceptrices	Marqueurs				
	<i>str-r</i> ₄₁ (HE)	<i>ami</i> A- <i>r</i> ₁ (HE)	<i>ami</i> A- <i>r</i> ₃ (LE)	<i>opt-r</i> ₂ (LE)	<i>ery-r</i> ₆ <i>ery-r</i> ₂
Cl ₃	1,00	1,10	0,15	0,20	0,60
	1,00	1,22	0,13	0,16	0,60
401	1,00	0,83	0,80	0,45	0,90
	1,00	0,85	0,82	0,48	0,95
	1,00	0,80	0,85	0,50	0,95

L'efficacité d'intégration d'un marqueur est déterminée par le rapport du nombre de transformées pour ce marqueur au nombre de transformées pour le marqueur de référence conférant la résistance à la streptomycine (*str-r*₄₁). Les souches Cl₃ et 401 sont transformées par le DNA de la souche 69 et par le DNA portant les deux marqueurs *str-r*₄₁ et *ery-r*₂.



Figure 3 - EFFET DE LA DOSE DE RADIATION ULTRAVIOLETTE SUR LA SURVIE DE DIVERSES SOUCHES.

La souche sauvage, Cl₃ (O), et le mutant qui donne seulement une forte efficacité, 401 (Δ), un mutant sensible à la lumière ultraviolette, 402 (●), et un mutant sensible à la lumière ultraviolette qui donne seulement une forte efficacité, 406 (▲) sont examinés pour la survie après irradiation ultraviolette.

priétés, un gène conférant la sensibilité aux UV est transféré dans Cl_3 (souche 402) et 401 (souche 406). Les doses suffisantes pour réduire la survie à 37% sont 155 ergs/mm^2 pour Cl_3 et 401 et 10 ergs/mm^2 pour 402 et 406. Ainsi la sensibilité à la lumière ultraviolette semble être indépendante de l'effet du gène 401 sur les efficacités de transformation.

La sensibilité aux rayons X de 401 est comparée à la sensibilité de la souche sauvage. Les deux souches sont inactivées de façon indentique (figure 4).

Les marqueurs génétiques portés par le DNA transformant sont inactivés par l'irradiation à la lumière ultraviolette. EPHRUSSI-TAYLOR, SICARD et KAMEN (26) ont observé que la sensibilité aux UV est plus élevée pour les marqueurs LE que pour les marqueurs HE appartenant au locus *ami A*. Cette corrélation inverse entre la sensibilité aux UV et l'efficacité d'intégration a été confirmée pour des marqueurs *mal⁻*, à différentes efficacités (58) pour des marqueurs de résistance à la méthicilline (52) et à la rifampine (TIRABY, SICARD et FOX en préparation).

Nous avons pensé qu'il serait intéressant de comparer la sensibilité de divers marqueurs dans les souches réceptrices 401 et Cl_3 . Lorsqu'une solution de DNA est irradiée par les UV, la perte de l'activité transformante d'un marqueur donné, dépend aussi du poids moléculaire du DNA donateur (75). Afin d'éviter les variations habituelles dans le poids moléculaire des différentes préparations de DNA, une seule solution de DNA est utilisée. Le DNA des souches 69 portant plusieurs marqueurs est irradié à différentes doses et utilisé pour transformer les deux souches Cl_3 et 401. Les résultats d'une expérience sont données dans la figure 5.

Les marqueurs à faible efficacité tels que *opt-r 2* et *ami A-r 9* sont moins sensibles dans la souche 401 que dans la souche Cl_3 . Ainsi dans la souche 401, les marqueurs LE présentent à la fois une augmentation d'efficacité de transformation, et une augmentation de résistance à l'inactivation par la lumière ultraviolette. De plus le marqueur de référence *str-r 41* est également plus résistant dans la souche 401 que dans Cl_3 . Si nous considérons que la corrélation inverse entre la sensibilité aux UV et l'efficacité d'intégration est correcte, alors l'efficacité intrinsèque du marqueur *str-r 41* doit être plus élevée dans la souche 401 que dans la souche sauvage. Ceci a été en effet confirmé.

PENETRATION DU DNA PENDANT LA TRANSFORMATION.

Les souches 401 et Cl_3 sont transformées par le DNA marqué à la thymidine tritiée de la souche 69. La préparation du DNA et les détails de l'expérience sont indiqués dans le chapitre précédent (114). La quantité de DNA transformant incorporée dans le génome des bactéries réceptrices est déterminée par le rapport du nombre de transformées *str-r 41*/ml au nombre de cpm/ml.

L'efficacité de base de transformation pour le marqueur de référence *str-r 41* augmente d'un facteur 1,5 à 1,6 par comparaison à la souche sauvage

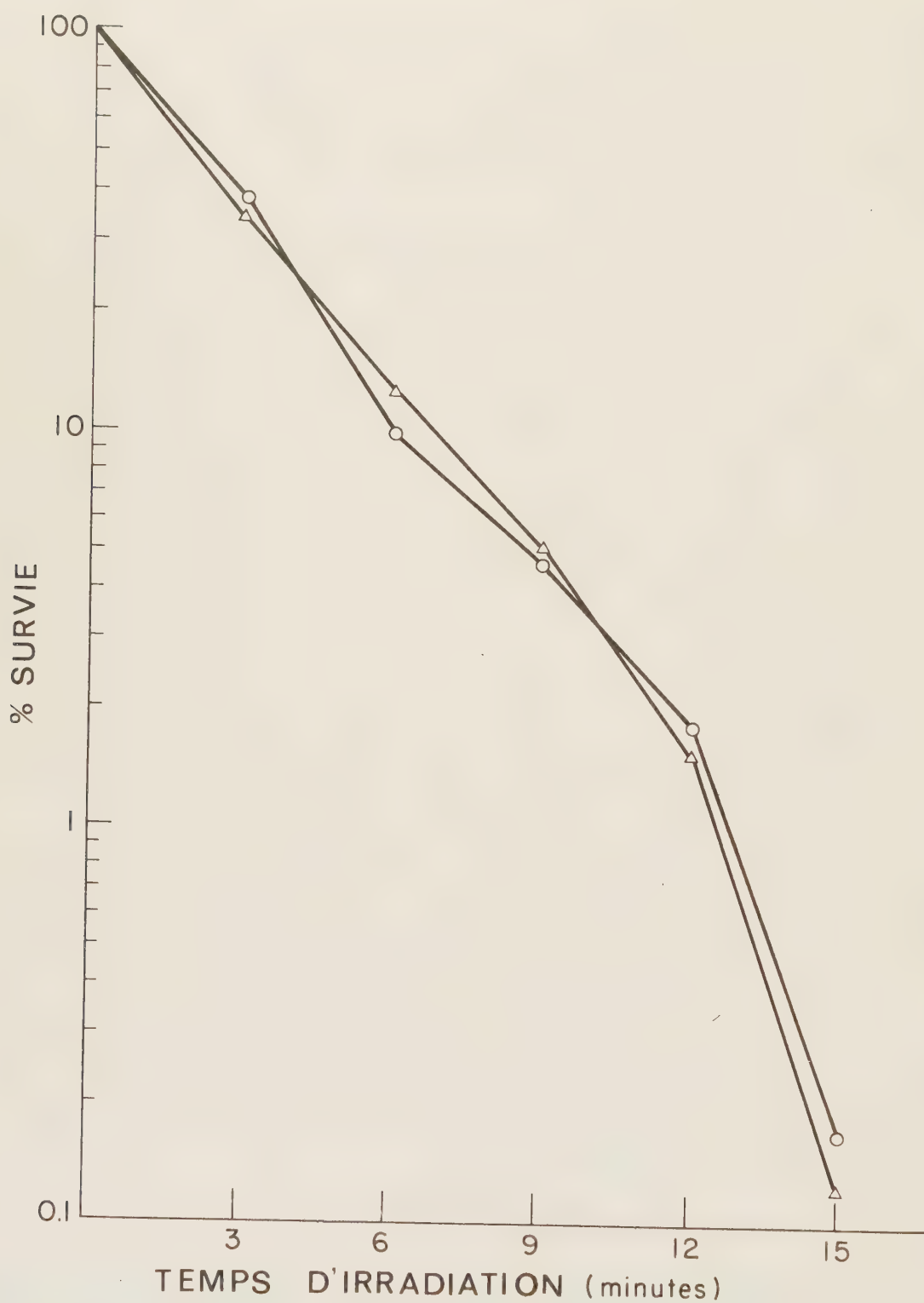


Figure 4 - EFFET DE LA DOSE DE RAYONS X SUR LA SURVIE DE DIVERSES SOUCHES.

L'irradiation est effectuée selon la méthode décrite dans la section "MATÉRIELS ET MÉTHODES". Les symboles sont les mêmes que dans la figure 3.

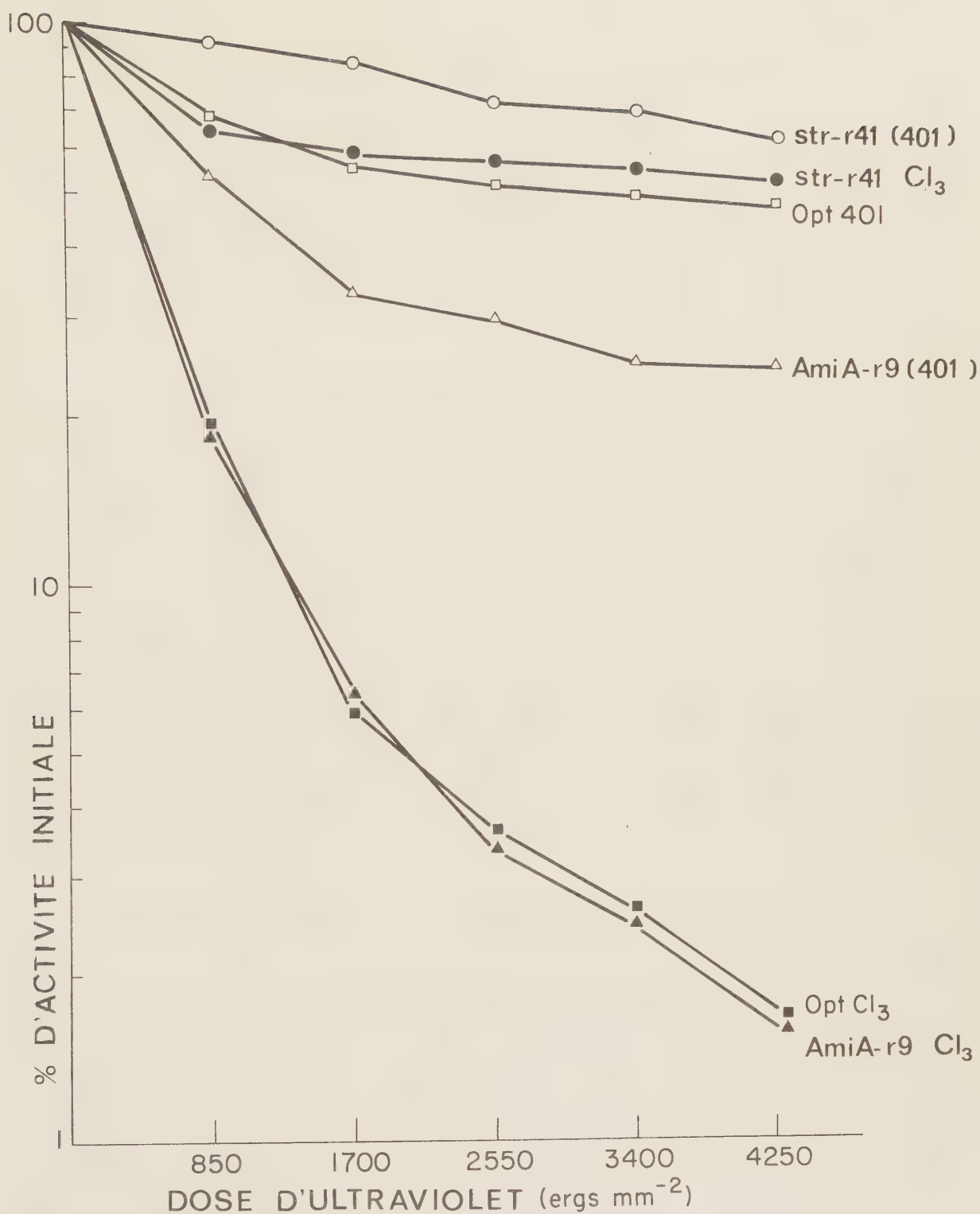


Figure 5 - INACTIVATION DES MARQUEURS *str-r41*, *opt-r2*, *amiA-r9* APRES IRRADIATION ULTRAVIOLETTE DU DNA EN SOLUTION.

Les souches réceptrices sont Cl₃ (symboles pleins) et 401 (symboles ouverts). Marqueurs: *str-r41* (cercles), *amiA-r9* (triangles) *opt-r2* (carrés).

(tableau 6).

Cette augmentation correspond à la différence existant entre les efficacités des marqueurs HE et des marqueurs à très forte efficacité VHE. Des mutants à très forte efficacité appartenant au locus *ami A* ont été également isolés dans notre laboratoire (Chapitre 3, 113). Ainsi, la même fraction des transformées HE est probablement perdue dans la souche réceptrice Cl₃. Puisque nous avons montré que les marqueurs LE sont intégrés dans la souche 401 presque aussi efficacement que les marqueurs HE, l'efficacité d'intégration est apparemment augmentée pour les deux types de marqueurs dans cette souche.

ABSENCE DE MODIFICATION DES MARQUEURS.

L'augmentation des efficacités des marqueurs LE dans la souche 401 pourrait provenir d'une modification de ces marqueurs de telle façon que l'appariement entre le brin donateur et le brin récepteur deviendrait maintenant permissif dans cette souche. Nous avons essayé de déterminer si les marqueurs LE deviennent du type HE après leur intégration dans la souche 401 et réextraction. Dans ce but, la souche 401 est transformée par le DNA de la souche 69 portant les mutations *opt-r 2*, *ami A-r 9* et *str-r 41*. Cinq colonies pour chacun des doubles transformées *opt-r*, *str-r* et *ami-r*, *str-r* sont prélevées. Le DNA de ces dix colonies est préparé et utilisé pour transformer la souche discriminante Cl₃. L'efficacité relative des marqueurs LE *opt-r 2* et *ami A-r 9* reste inchangée et correspond à une valeur environ six fois moindre que celle de l'efficacité du marqueur de référence *str-r 41*. Ainsi les marqueurs LE ne sont pas modifiés après passage dans la souche 401.

ABSENCE DE FACTEURS EXOCELLULAIRES RESPONSABLES DES EFFICACITES DES MARQUEURS.

OTTOLENGHI et HOTCHKISS (85) ont observé une augmentation des protéines dans le milieu au moment de la compétence. Outre l'activateur, d'autres protéines sont synthétisées par les cellules compétentes (124). TOMASZ et ZANATI (127) ont montré qu'un de ces facteurs protéiques induisaient l'agglutination des cellules compétentes dans le milieu. Des expériences ont été entreprises dans le but de détecter la présence d'une protéine soit dans le milieu soit à la surface des cellules, qui pourrait rendre compte de la différence de l'efficacité de transformation des marqueurs LE dans les souches Cl₃ et 401. La compétence d'une culture de la souche 401 portant un marqueur de résistance à l'érythromycine (*ery-r*) (3×10^6 C. F. C./ml) est induite par les cellules compétentes de la souche Cl₃ (3×10^7 C. F. C./ml) et d'autre part la compétence de la culture de la souche Cl₃ portant le marqueur érythromycine est induite par les cellules compétentes de la souche 401. Après transformation par le DNA portant les mutations *ami A-r 28* (HE) *opt-r 2* (LE)

TABLEAU 6

PÉNÉTRATION DU DNA ET EFFICACITÉ DE TRANSFORMATION DANS LES SOUCHES Cl_3 ET 401

Souches réceptrices	Concentration du DNA ($\mu\text{g/ml}$)	cpm/ml	Nombre de transformées streptomycine / 10^4 ml de culture $\times 10^4$	str^+r^- /cpm
Cl_3	0,25	14 930	313	1,0
	0,25	10 370	243	
	0,05	2 510	57	
401	0,25	13 120	450	1,5
	0,25	8 750	335	
	0,05	2 530	83,4	

Les valeurs de str^+r^- /cpm sont les moyennes des valeurs obtenues avec les trois expériences rapportées dans ce tableau. Une nouvelle préparation de culture compétente est utilisée dans chaque cas.

et *str-r 41*, les efficacités de ces marqueurs parmi les cellules 401 et Cl_3 des deux cultures mélangées, sont déterminées. Le marqueur conférant la résistance à l'érythromycine est utilisé pour sélectionner les bactéries 401 parmi les bactéries Cl_3 et vice versa.

Dans ces conditions, chacune des deux souches conserve ses propriétés propres en ce qui concerne les efficacités des marqueurs (tableau 7).

MODE D'INTEGRATION DES MARQUEURS.

Les mesures de pénétration du DNA radioactif ont montré que l'efficacité d'intégration de *str-r 41* dans la souche 401 est aussi élevée que celle des marqueurs à très forte efficacité (VHE) dans la souche sauvage. GRAY et EPHRUSSI-TAYLOR (40) ont proposé l'hypothèse que les efficacités des marqueurs VHE et LE pourraient être expliquées par l'intervention spécifique d'un système d'excision et de synthèse réparatrice. Selon la nature des bases mal appariées de l'hétérozygote dans la région hétéroduplex entre le brin donateur et le brin récepteur, le mécanisme de correction envisagé, excise préférentiellement soit le brin récepteur (pour les marqueurs VHE), soit le brin donateur (pour les marqueurs LE) ou n'excise aucun brin (pour les marqueurs HE). La possibilité d'une différence dans la reconnaissance de diverses bases mal appariées dans la souche discriminante nous a incité à étudier le mode d'intégration des marqueurs dans la souche 401.

1) - Cinétique de division des bactéries transformées.

Dans la souche discriminante Cl_3 , les bactéries transformées pour un marqueur LE commencent à augmenter en nombre environ une génération plus tôt que les bactéries transformées pour un marqueur HE (65). Cette différence est un argument en faveur de l'hypothèse que l'intégration d'un marqueur LE conduit à l'altération des deux brins du DNA récepteur alors que l'intégration d'un marqueur HE conduit à l'altération d'un seul brin du génome récepteur.

Les cinétiques de division des cellules transformées pour les marqueurs LE et HE sont déterminées dans Cl_3 et 401. La méthode expérimentale est décrite dans la section "MATÉRIELS ET MÉTHODES".

On peut voir dans la figure 6 que les transformées pour la mutation à faible efficacité *ami A-r 9* commencent à se multiplier dans la souche réceptrice sauvage avant les transformées pour la mutation HE *ami A-r 1*. Ces deux types de marqueurs appartiennent au même locus. Le temps qui sépare le début de division des deux types de marqueurs est d'environ 25 minutes, ce qui correspond au temps d'une génération dans le milieu P (103). Le temps du début de division dans la souche mutante est le même pour les deux marqueurs *ami A* examinés et correspond à celui trouvé pour les marqueurs HE dans la souche Cl_3 .

TABEAU 7
EFFICACITE D'INTEGRATION DE OPT-r2 MESUREE DANS UNE CULTURE DE Cl₃ RENDUE COMPETENTE
PAR LES CELLULES DE 401 ET DANS UNE CULTURE DE 401 RENDUE COMPETENTE PAR LES CELLULES DE Cl₃.

	Nombre de transformées				Efficacités	
	Population totale	Population minoritaire <i>ery-r</i>				
	<i>Str-r</i> x 10 ⁴	<i>Opt-r</i> x 10 ⁴	<i>Str-r, ery-r</i> x 10 ²	<i>Opt-r, ery-r</i> x 10 ²	<i>Opt-r/st-r</i>	<i>Opt-r, ery-r/ st-r, ery-r</i>
Cellules réceptrices						
401 <i>ery-r</i> compétent						
Cl ₃ ajouté	93	17,6	100	56	0,19	0,56
401 <i>ery-r</i> (contrôle)			0	0	—	—
Cl ₃ <i>ery-r</i> compétent						
401 ajouté	180	108	210	37,8	0,60	0,18
Cl ₃ <i>ery-r</i> (contrôle)			0	0	—	—

Une culture en phase exponentielle de 401 ery-r ou de Cl₃ ery-r (3 x 10⁶ centres formateurs de colonies/ml) est mélangée avec un volume égal de cellules très compétentes de Cl₃ ou de 401 (3 x 10⁷ centres formateurs de colonies/ml). Ces cultures mélangées sont mises en contact avec du DNA portant les marqueurs str-r 41, opt-r 2 et ami A-r28 pendant 30 minutes. Les transformées sont alors sélectionnées par la méthode de la double couche. Comme contrôle pour le niveau de compétence sans induction, les cultures de Cl₃ ery-r ou 401 ery-r sont mélangées avec un volume égal de milieu de compétence préchauffé. Le DNA est ajouté pendant 30 minutes.

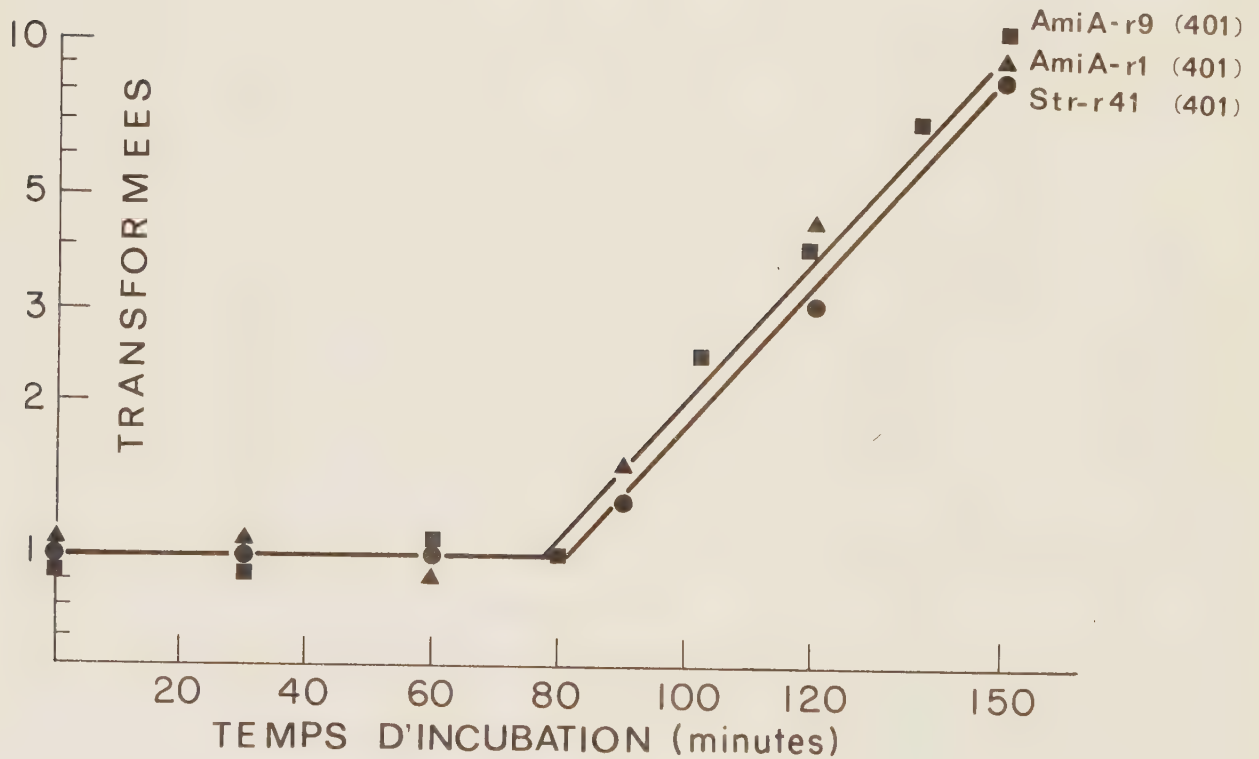
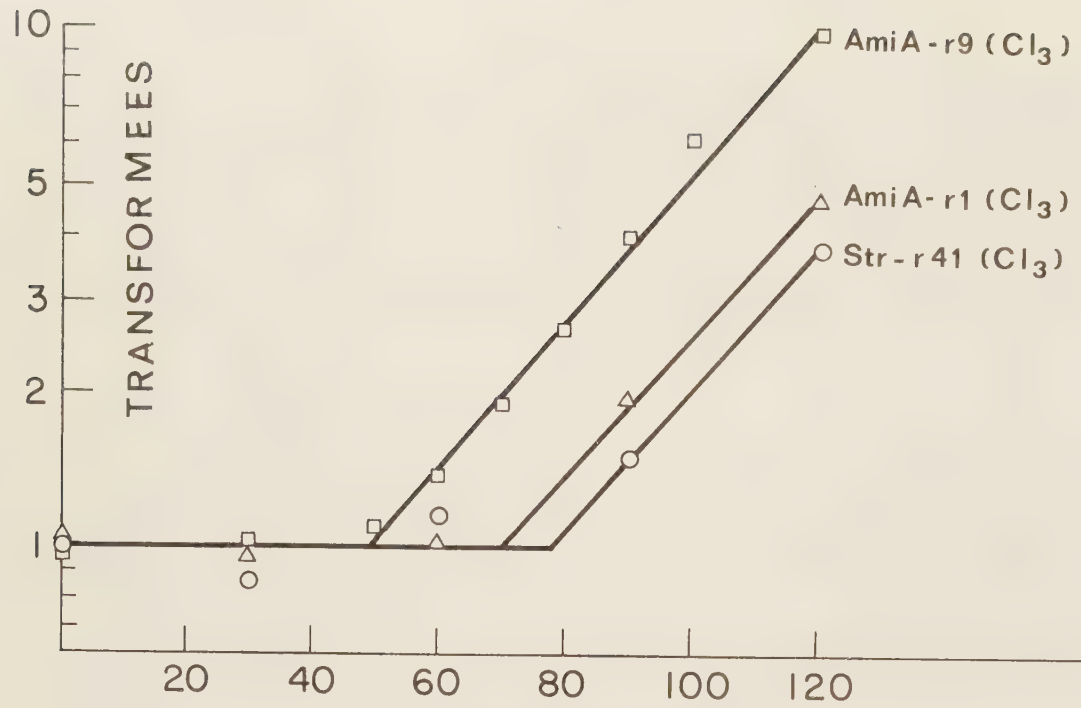


Figure 6 - MULTIPLICATION DES TRANSFORMEES POUR DIVERS MARQUEURS DANS LES SOUCHES 401 ET Cl_3

La souche sauvage (Cl_3) et la souche mutante (401) sont transformées par du DNA des souches 69 et 39.

2) - *Cinétique d'apparition des bactéries transformées phénotypiquement exprimées.*

EPHRUSSI-TAYLOR (25) a montré qu'un marqueur LE semble exprimer son phénotype plus tôt qu'un marqueur HE. Ce comportement différent peut être attribué au fait que les marqueurs LE modifient les deux brins du DNA récepteur alors que les marqueurs HE sont intégrés dans l'un ou l'autre brin mais ne modifient pas le brin complémentaire (46). Puisque un seul brin du DNA est transcrit en RNA messenger, un cycle supplémentaire de division du DNA est nécessaire pour que tous les marqueurs HE soient exprimés, alors que tous les marqueurs LE peuvent être exprimés sans l'intervention de ce cycle de duplication.

Les cinétiques d'apparition des marqueurs *opt-r 2* et *str-r 41* phénotypiquement exprimés sont déterminées dans les deux souches Cl_3 et 401. La méthode expérimentale retenue est très similaire à celle utilisée dans l'expérience décrite plus haut, excepté que l'on ne permet pas aux transformées d'exprimer leur phénotype avant d'être sélectionnées par l'antibiotique.

Le temps auquel un nombre correspondant à 50 % de la totalité des transformées est atteint, est approximativement le même pour les deux souches (figure 7), alors que les transformées *opt-r 2* sont exprimées 15 à 20 minutes plus tard dans la souche 401 que dans la souche Cl_3 (figure 8). Ce résultat suggère que les marqueurs LE sont exprimés plus tardivement dans la souche 401, à un moment correspondant aux marqueurs HE dans la souche Cl_3 . Il apparaît donc que dans la souche mutante, les marqueurs HE et LE se comportent comme les marqueurs HE dans la souche sauvage.

3) - *Détermination de la fréquence des doubles transformées dans les souches Cl_3 et 401.*

LOUARN et SICARD (68) ont montré que la fréquence des bactéries doublement transformées est caractéristique du mode d'intégration des marqueurs. Lorsque la souche Cl_3 est utilisée comme réceptrice, l'information génétique des marqueurs HE est transmise au hasard dans l'un ou l'autre brin du DNA récepteur, alors que les marqueurs LE modifient les brins du génome récepteur. La fréquence des doubles transformées pour une paire de marqueurs LE - LE ou HE - LE sera plus élevée que celle correspondant à une paire de marqueurs HE - HE. C'est ainsi que la valeur R du rapport $R = (D \times N) / (A \times B)$ dépendra des efficacités des marqueurs sélectionnés (N est le nombre de centres formateurs de colonies par ml ; D, le nombre de bactéries doublement transformées pour les marqueurs indépendants A et B ; A et B, le nombre de transformées pour l'un ou l'autre de ces marqueurs). Ces valeurs sont déterminées pour plusieurs marqueurs dans chacune des deux souches, Cl_3 et 401.

Les complexes bactéries - DNA (décrits dans la section "MATÉRIELS ET MÉ-

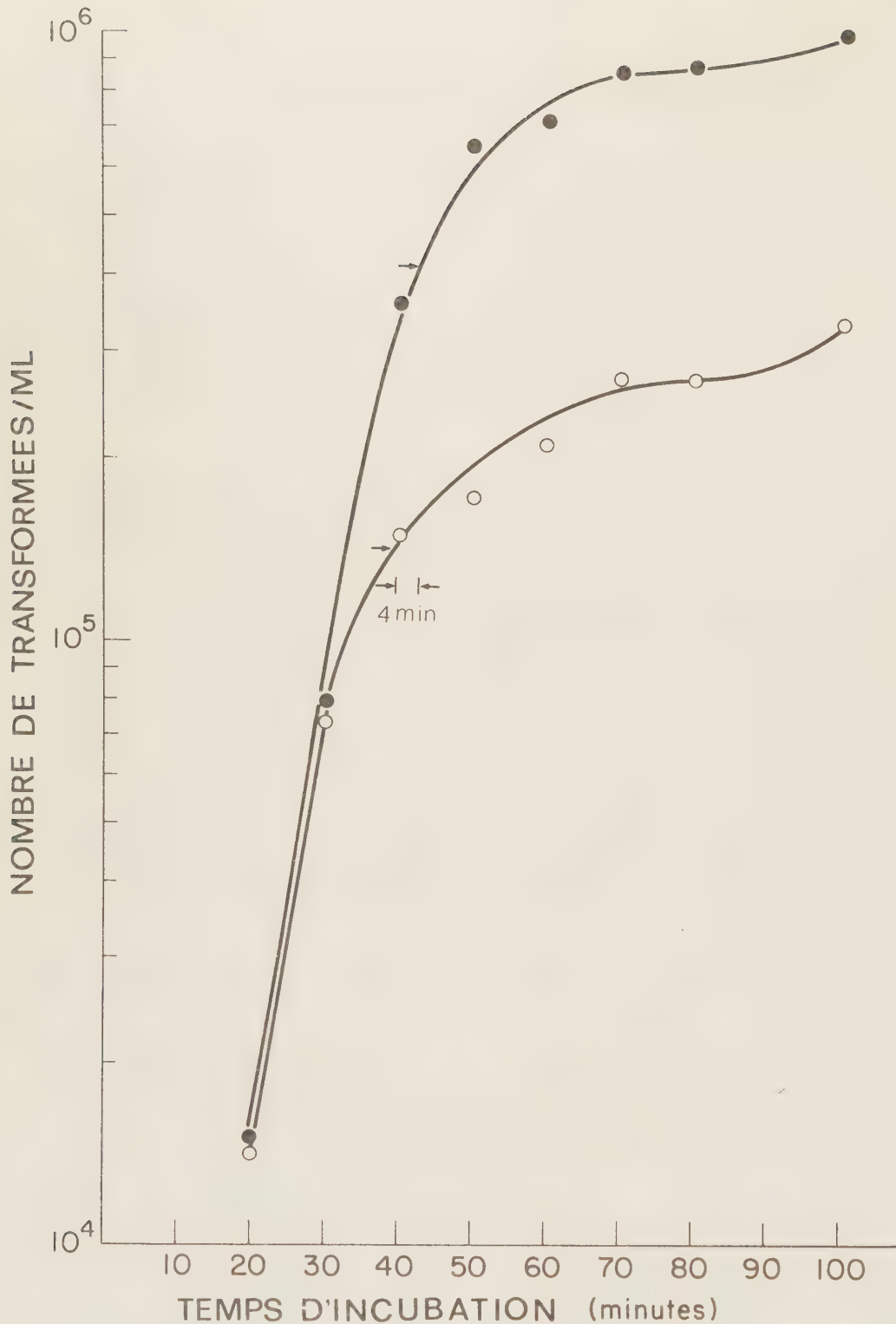


Figure 7 - EXPRESSION PHENOTYPIQUE D'UN MARQUEUR A FORTE EFFICACITE DANS LES SOUCHES 401 ET Cl₃

Les cinétiques d'apparition des transformées *str-r41* sont déterminées dans Cl₃ (symboles ouverts) et dans 401 (symboles fermés). Les flèches indiquent le nombre de transformées correspondant à 50% du nombre maximum de transformées, déterminé selon la méthode décrite dans la section "MATERIELS ET METHODES".

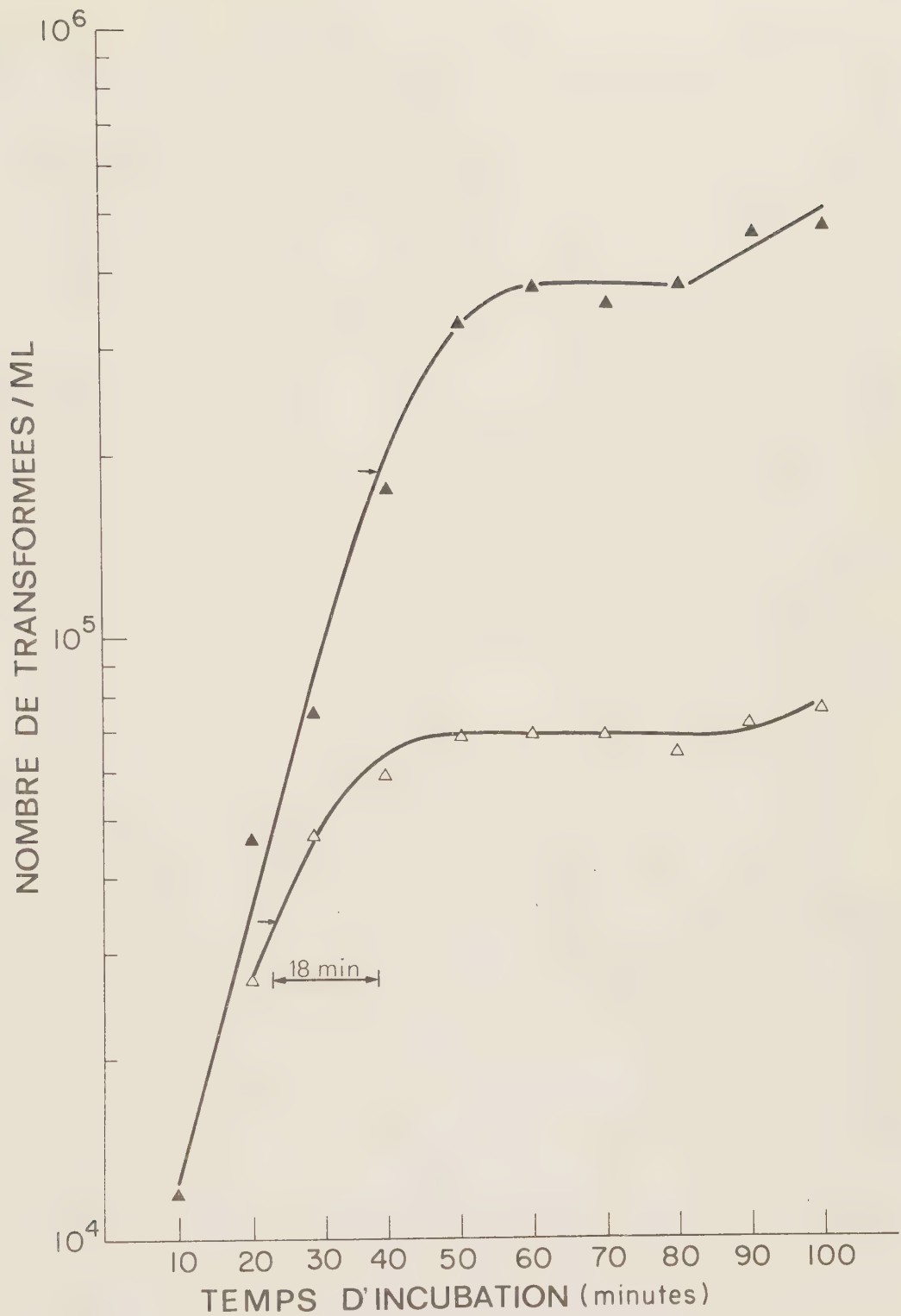


Figure 8 - EXPRESSION PHENOTYPIQUE D'UN MARQUEUR A FAIBLE EFFICACITE DANS LES SOUCHES 401 ET Cl₃.

Les cinétiques d'apparition des transformées *opt-r2* sont déterminées dans Cl₃ (symboles ouverts) et dans 401 (symboles fermés). Les flèches indiquent le nombre de transformées correspondant à 50% du nombre de transformées, déterminé selon la méthode décrite dans la section "MATERIELS ET METHODES".

THODES") donnant une efficacité de transformation d'au moins 10 % par rapport au nombre total de centres formateurs de colonies sont retenus pour ces expériences. Cette fréquence élevée de transformation n'est obtenue que dans le cas où toutes les bactéries dans la culture sont compétentes. Les doubles transformées sont isolées en utilisant la même concentration d'antibiotique que pour la sélection de chacune des simples transformées. Les valeurs R obtenues dans trois expériences différentes avec Cl_3 et dans quatre expériences avec 401 sont données dans le tableau 8. Dans la souche 401, les valeurs obtenues pour les trois paires de marqueurs considérés sont identiques entre elles et avec celles obtenues pour la paire de marqueurs HE - HE : *ami A-r 1*, *str-r 41* dans la souche Cl_3 . D'après ce critère tous les marqueurs semblent être transformés dans la souche 401 par le même mécanisme de recombinaison que les marqueurs à forte efficacité dans la souche Cl_3 .

Ainsi les résultats expérimentaux dans leur ensemble éliminent l'hypothèse de l'intervention d'un mécanisme de correction pour les marqueurs VHE et sont en faveur d'un mode unique d'intégration des marqueurs dans la souche 401. Le produit d'intégration de tous les marqueurs dans la souche mutante semble être identique à celui des marqueurs HE dans la souche Cl_3 .

DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans la souche standard de *Diplococcus pneumonia* (Cl_3) qui est capable de discriminer entre les divers marqueurs le nombre de transformées pour les marqueurs à faible efficacité (LE) est très inférieur à celui des transformées pour les marqueurs à forte efficacité (HE). De leur travail, EPHRUSSI-TAYLOR (25) et LOUARN et SICARD (68 - 70) ont conclu que les souches discriminantes produisent des transformées LE qui sont homozygotes alors que les transformées HE sont hétérozygotes. Notre analyse de la ségrégation et du temps requis pour l'expression du phénotype des deux sortes de marqueurs a confirmé ce comportement des transformées dans la souche Cl_3 . On ignore encore la nature précise du mécanisme qui rend les marqueurs LE homozygotes. Plusieurs modèles différents pourraient expliquer les caractéristiques de cette classe de marqueurs.

1) - Les marqueurs LE sont intégrés par l'intermédiaire d'une insertion d'un seul brin du DNA donateur, suivi par la correction de bases mal appariées par un mécanisme d'excision et de réparation.

2) - Les marqueurs LE sont intégrés par l'intermédiaire d'une insertion d'un seul brin du DNA donateur juste avant la fourche de duplication.

3) - Les marqueurs LE sont intégrés par l'intermédiaire d'une inser-

TABLEAU 8

VALEURS DE R POUR DIVERSES PAIRES DE MARQUEURS DANS LA TRANSFORMATION DE Cl_3 et 401

Souches réceptrices	Paires de marqueurs		
	<i>ami A-r1, str-r 41</i> (HE-HE)	<i>opt-r2, str-r 41</i> (LE-HE)	<i>opt-r2, ami A-r1</i> (LE-HE)
Cl_3	0,28	0,38	0,39
	0,34	0,45	0,45
	0,37	0,46	0,48
	0,33	0,43	0,44
	Moyenne		
401	0,29	0,30	0,29
	0,35	0,35	0,33
	0,38	0,39	0,36
	0,38	0,40	0,38
	Moyenne	0,36	0,34

Les valeurs rapportées de R correspondant au rapport DN/AB sont calculées à partir de trois expériences indépendantes pour Cl_3 et quatre pour 401. Le DNA de la souche 39 portant les marqueurs *str-r 41, opt-r2* et *ami A-r1* est utilisé dans toutes ces expériences.

tion en double brin du DNA donateur.

L'intégration des deux classes de marqueurs dans la souche 401 se fait par des événements de recombinaison qui sont ceux caractéristiques des marqueurs à forte efficacité dans Cl_3 . GURNEY et FOX (46) ont montré que dans la souche R6, souche similaire à Cl_3 , le DNA recombinant pour les marqueurs HE contient un fragment monocaténaire du DNA donateur, inséré dans le DNA du génome récepteur. Puisque les marqueurs *ami* A-r 9 (LE) et *ami* A-r 1 (HE) sont des mutations ponctuelles (105), la différence dans les efficacités d'intégration entre les deux marqueurs dans Cl_3 , pourrait s'expliquer par l'existence de une ou plusieurs enzymes capables de faire une distinction entre les différentes bases mal appariées. La souche mutante 401 qui a perdu la propriété de discrimination entre les mutations *ami* A-r 9 et *ami* A-r 1 pourrait être déficiente pour une telle enzyme. Le comportement de la souche 401 ne nous permet pas de faire une distinction entre les hypothèses que nous venons de mentionner puisqu'elles impliquent toutes une enzyme qui reconnaît certains types de bases mal appariées et d'une manière ou d'une autre élimine quelques classes. PETERSON et GUILD (88) ont également montré par une approche différente que dans la souche Rx, identique avec 401 pour l'absence de discrimination (voir chapitre IV et appendice I), l'intégration de tous les marqueurs examinés se réalise par la seule insertion de l'un ou de l'autre brin du DNA donateur.

La sensibilité de la souche 401 aux UV et aux rayons X est identique à celle de Cl_3 . De plus nous avons montré que l'introduction par transformation dans Cl_3 et 401, d'une mutation dans un gène gouvernant probablement l'excision des dimères de pyrimidine du DNA des cellules irradiées (voir chapitre X) n'a aucun effet sur le processus de discrimination. Ainsi le processus de discrimination apparaît être soit partiellement soit complètement indépendant du mécanisme de réparation des lésions UV par excision et synthèse. Ce résultat est en accord avec l'observation de LOUARN et SICARD (66) montrant que l'inhibition des enzymes de réparation par la caféine ne modifie pas l'efficacité caractéristique des marqueurs.

2ème PARTIE

PROPRIETES DU PROCESSUS DE DISCRIMINATION

Dans la première partie de cette thèse, nous avons présenté l'isolement et les propriétés d'une souche non discriminante. La découverte relativement récente du phénotype de ces souches hex^- a permis de faire considérablement progresser nos connaissances sur le processus de discrimination. Dans cette deuxième partie, nous présenterons de nouvelles propriétés associées à la fonction hex et notamment nous analyserons la spécificité de reconnaissance de ce processus.

CHAPITRE III

EFFICACITES D'INTEGRATION DE MUTANTS SPONTANES AU LOCUS *ami* A

Les résultats d'analyses génétiques effectuées par GRAY et EPHRUSSI-TAYLOR (40) et LOUARN et SICARD (69) et d'expériences physico-chimiques entreprises par SHOEMAKER et GUILD (102) suggèrent fortement que les étapes initiales de l'intégration conduisant à la formation d'un DNA hétéroduplex sont indépendantes de l'efficacité du marqueur présent dans l'hétérozygote. Comme l'action de la fonction hex est finie en moins de 6 minutes après la pénétration du DNA transformant dans la cellule (102) cette action doit s'exercer sur la structure hétéroduplex. L'élément le plus vraisemblable qui va déterminer si un hétéroduplex donné sera ou ne sera pas soumis au mécanisme de discrimination est l'hétérozygote formé par les deux allèles au site de la mutation. Dans le cas des mutations ponctuelles, nous pouvons raisonnablement penser que ce sera la nature de la paire de bases mal appariées qui entraînera ou n'entraînera pas l'action du système de discrimination. Les différences observées dans les efficacités individuelles de divers marqueurs montrent que le système de discrimination doit posséder une grande spécificité de reconnaissance. C'est ainsi que les marqueurs auxotrophes ou ceux conférant la résistance aux antibiotiques sont généralement divisés en plusieurs classes selon l'efficacité avec laquelle ils sont intégrés dans les cellules réceptrices. Quatre classes ont été trouvées pour les mutations dans le locus amyloamylase (58). Les mutations dans le locus *ami* A qui déterminent la résistance à l'aminoptérine (26) ou les mutants qui exigent l'uracile (81) ou la thymidine (35) se groupent dans seulement deux classes distinctes, une classe à forte efficacité et une classe à faible efficacité. Les efficacités relatives d'intégration des différentes mutations du locus déterminant la résistance à la streptomycine (13), ou du locus de l'érythromycine (54) varient dans un large spectre. Cette disparité dans la classification des mutations sur la base de leur efficacité d'intégration individuelle peut avoir plusieurs origines telles que : la nature de la fonction physiologique du gène considéré, la nature des mutagènes utilisés pour induire les mutations, ou le génome des souches de pneumocoques.

Dans le but de déterminer la nature des différences structurales qui sont associées avec les mutations possédant des efficacités d'intégration différentes, nous avons pensé qu'il était intéressant de savoir sans ambiguïté si oui ou non les marqueurs se groupent dans des classes bien définies. Les mutants du locus *ami* A dont le produit ne semble pas être vital pour les cellules (128) ont été retenus pour cette étude. Puisque les mutations spontanées chez les bactéries renferment le plus large spectre de lésions mutationnelles (22), nous avons analysé les effi-

cacités d'intégration des seules mutations spontanées du locus *ami* A. Les mutants résistants à l'aminoptérine ont été isolés dans la souche discriminante Cl₃ et la souche non discriminante 401.

MATERIELS ET METHODES

Souches : La souche discriminante Cl₃ et la souche non discriminante 401 ont été utilisées comme souches réceptrices.

Sélection des transformées : Les compositions des milieux et les méthodes de transformation sont décrites dans le chapitre 1 (114). Les cellules compétentes sont mises en contact avec le DNA préparé à partir des souches Cl₃ ou 401 portant le même marqueur *str-r* 41 et une mutation *ami* A isolé indépendamment et sont incubées pendant 20 minutes à 37°. Une portion de chaque culture transformée est congelée à -70° après l'addition de 10 % de glycérol. La portion restante est utilisée le même jour pour estimer la fréquence de transformation. Les cellules sont mélangées à du milieu nutritif gélosé et sont mises à pousser pendant 2 heures avant l'addition d'une deuxième couche contenant la streptomycine ou l'aminoptérine pour sélectionner les transformées. Le jour suivant un nombre plus précis des transformées *str-r* et *Ami-r* est déterminé par la même méthode, après une dilution appropriée des cultures dégelées.

*Isolement des mutations spontanées dans le locus *ami* A* : Une culture dégelée de la souche Cl₃ *str-r* 41 ou de la souche 401 *str-r* 41 est diluée dans du milieu néopeptone préchauffé jusqu'à une densité d'environ 10³ bactéries par ml. La culture diluée est alors distribuée en échantillons de 1 ml dans des petits tubes. Quand les cellules atteignent une densité suffisante après plusieurs heures d'incubation à 37°, la croissance est arrêtée par refroidissement du tube ; une fraction de chaque culture est alors étalée dans une petite boîte de pétri contenant du milieu gélosé, de la streptomycine (200 µg/ml) et de l'aminoptérine (10⁻⁵ M). Des cultures sont préparées à partir d'une seule colonie prélevée dans chaque boîte. Puis les cultures sont examinées pour leur sensibilité à un excès d'isoleucine dans le milieu minimum (103). Puisque les mutants *ami* A sont sensibles à un excès d'isoleucine (103), les clones résistants à l'aminoptérine mais présentant le même niveau de résistance à l'isoleucine que la souche sauvage sont éliminés ; le nombre de tels clones correspond à environ 10 % du nombre total de colonies prélevés.

Préparation des lysats : Une culture dégelée d'un mutant résistant à l'aminoptérine est diluée 20 fois dans 10 ml de milieu de croissance et incubée pendant 5 à 6 heures à 37°. Les cellules sont collectées par centrifugation, et le culôt est remis en suspension dans 1 ml de la solution 0,1 M tris (hydroxymé-

thyl) aminométhane 0,01 M acide éthylènediaminotétraacétique et 0,1 % désoxycholate de sodium. Après la lyse des cellules, le DNA est précipité avec 2 ml d'alcool. Les fibres d'acide nucléique sont séparées et dissoutes dans la solution 0,2 M chlorure de sodium- 0,02 M citrate de sodium. Ces préparations brutes de DNA sont stables pendant 1 mois ; après cette période elles perdent graduellement leur activité transformante.

Mesure des taux de mutations spontanées : Le taux de mutations spontanées dans les souches Cl₃ et 401 est déterminé par deux méthodes différentes. La première méthode, imaginée par LURIA et DELBRUCK (72) dépend des fluctuations du nombre de mutants dans différentes cultures ayant atteint la même densité cellulaire. Le nombre moyen de mutants *ami-r* capable de former des colonies dans le milieu sélectif (r) est calculé à partir de 25 cultures indépendantes (C) préparées pour l'isolement de mutations spontanées dans le locus *ami A*, selon la méthode décrite plus haut. Le nombre final de centres formateurs de colonies (Nt) est déterminée par étalement des cellules de cinq cultures dans un milieu non sélectif. Les cellules de la souche Cl₃ *str-r 41* et de la souche 401 *str-r 41* poussent avec le même nombre moyen de coques par chaîne (2, 3). Ce nombre est déterminé par comptage visuel dans une chambre de Petroff-Hauser grâce à un microscope.

Le taux de mutation (a) est estimé par interpolation à partir de l'équation : $r = a Nt \ln (C Nt a)$.

La seconde méthode, mise au point par NEWCOMBE (83), est basée sur la détermination du nombre de nouveaux mutants apparaissant pendant un intervalle de croissance dans une population bactérienne. Le taux de mutation est donné par : $a = (M_2 - M_1) (N_2 - N_1) \ln 2$. M_2 et M_1 correspondent au nombre de mutants aux temps t_2 et t_1 ; N_2 et N_1 correspondent au nombre de cellules aux temps t_2 et t_1 .

Une culture dégelée de Cl₃ *str-r 41* ou de 401 *str-r 41* est diluée 1 000 fois dans le milieu néopeptone et incubée pendant 30 minutes. Puis 0,1 ml de la culture est étalée sur la surface d'une boîte de pétri contenant 10 ml de gélose nutritive et 0,5 ml de sang de cheval. Environ 30 boîtes préparées de la même manière en moins de 10 minutes sont incubées à 37°. Les mutants résistants à l'aminoptérine sont sélectionnés dans des intervalles de 30 minutes, commençant après 150 minutes d'incubation, en versant avec précaution une seconde couche de milieu gélosé nutritif contenant le double de la concentration sélective d'aminoptérine (2×10^{-5} M). Le nombre de cellules à différents temps est déterminé en resuspendant d'abord les cellules dans 5 ml de milieu par grattage de la surface des boîtes, et ensuite en les étalant dans un milieu non sélectif après dilutions adéquates.

RESULTATS

DISTRIBUTION DES EFFICACITES D'INTEGRATION DES MUTANTS *ami A* APPARAISSANT DANS LES SOUCHES Cl_3 et 401.

L'efficacité d'intégration d'un marqueur génétique donné, a été définie de façon identique par plusieurs chercheurs (12-26-54-58-60). Elle est déterminée par le rapport du nombre de transformées pour un marqueur donné au nombre de transformées pour un marqueur de référence. Le marqueur de référence (*str-r 41* dans ce chapitre) sert à mesurer, essentiellement, la quantité relative de DNA porteur de la mutation *str-r 41* qui est intégrée dans les génomes récepteurs.

La distribution des efficacités d'intégration de 105 mutants *ami A* indépendants, apparus spontanément dans la souche Cl_3 , mesurées dans la souche discriminante Cl_3 , est montrée dans la figure 9. Dans nos conditions de transformation, ces valeurs sont reproductibles, et habituellement la variabilité est du même ordre de grandeur que l'erreur amputée à la technique d'étalement (10 %). Sur la base de la fréquence de distribution, les efficacités individuelles d'intégration ne semblent pas être distribuées au hasard puisque quatre classes sont discernables : faible (0,05 à 0,30) intermédiaire (0,3 à 0,7), forte (0,7 à 1,3) et très forte (1,3 à 1,75). Cependant, la distinction entre les classes n'est pas aussi nette que les classes rapportées par LACKS (58) pour les mutants amylomaltase, ou par SIROTNAK et HACHTEL (108) pour les mutants résistants à l'améthoptérine. Les mutants qui se rangent dans la classe à forte efficacité ou dans la classe à faible efficacité sont sensiblement égaux en nombre, en bon accord avec les résultats de EPHRUSSI-TAYLOR, SICARD et KAMEN (26), alors que les mutants avec une efficacité intermédiaire ou une efficacité très forte sont bien moins nombreux.

Les efficacités relatives d'intégration de 88 mutants *ami A* indépendants, apparus spontanément dans 401, déterminées dans la souche réceptrice Cl_3 , sont données dans la figure 10. Des classes similaires à celles trouvées avec la souche Cl_3 sont discernables parmi ces mutants. Cependant la répartition des mutants parmi les quatre classes dans la souche 401 est significativement différente de celle trouvée dans la souche Cl_3 , comme le montre le test statistique χ^2 (Tableau 9). Pour le même nombre de mutations à faible efficacité dans les deux souches, les mutations avec une forte ou une très forte efficacité d'intégration apparaissent avec une fréquence considérablement moins élevée dans la souche Cl_3 .

La distribution des efficacités d'intégration des mutants isolés dans la souche non discriminante pourrait être expliquée par une fréquence réduite de la production des mutations les plus efficaces. Une explication plus plausible serait que les événements initiaux qui conduisent à une mutation spontanée, tel que la formation d'un hétérozygote, pourrait être identique aux événements transitoires

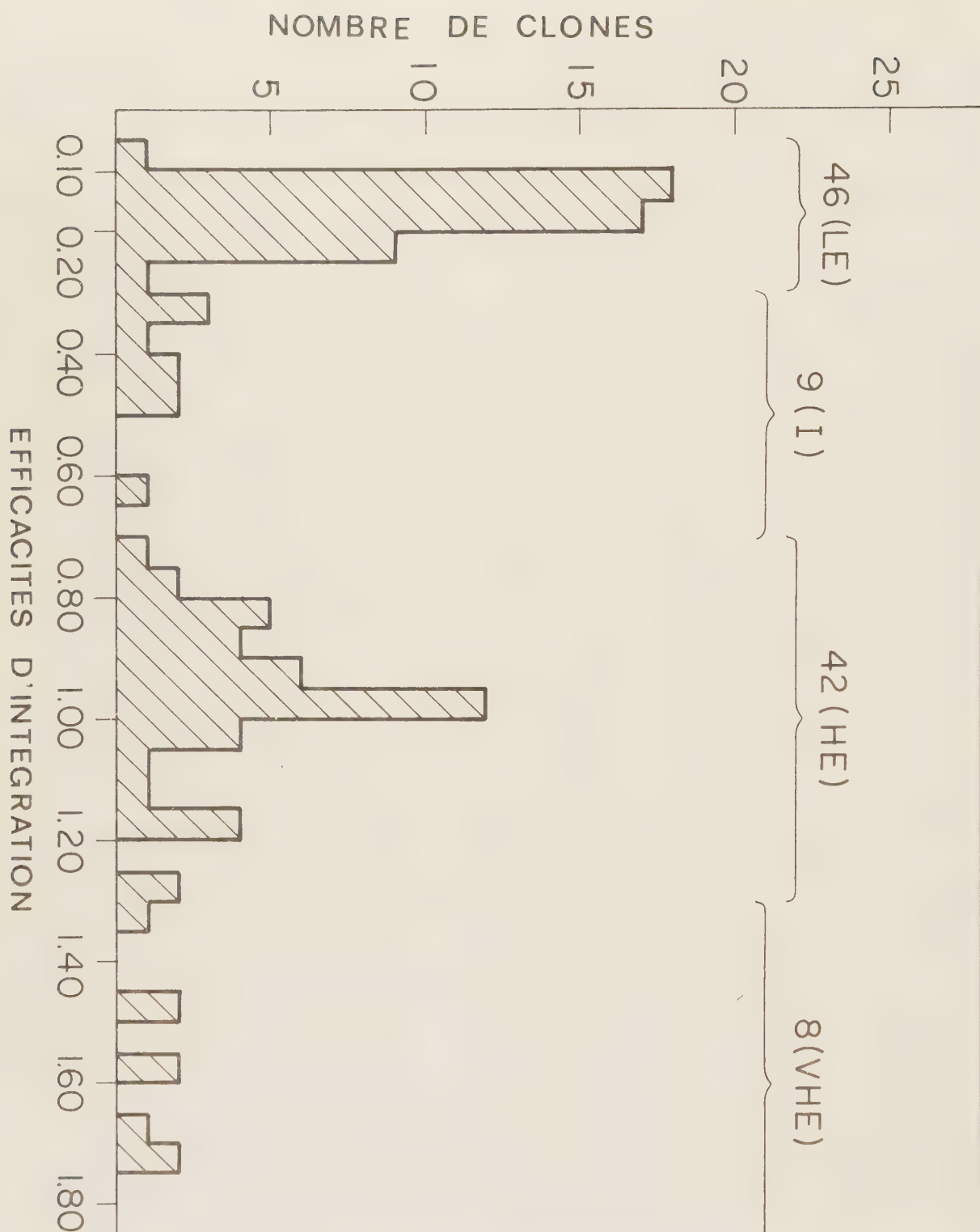


Figure 9 - DISTRIBUTION DES EFFICACITES D'INTEGRATION DE MUTATIONS SPONTANÉES Ami-A ISOLÉES DANS Cl_3 .

Chaque barre représente le nombre de mutations dont les efficacités sont comprises dans un intervalle de 0,01. Les crochets indiquent les classes faible efficacité (LE), efficacité intermédiaire (IE), forte efficacité (HE), et très forte efficacité (VHE), ainsi que le nombre des mutations distinctes dans chacune d'elles.

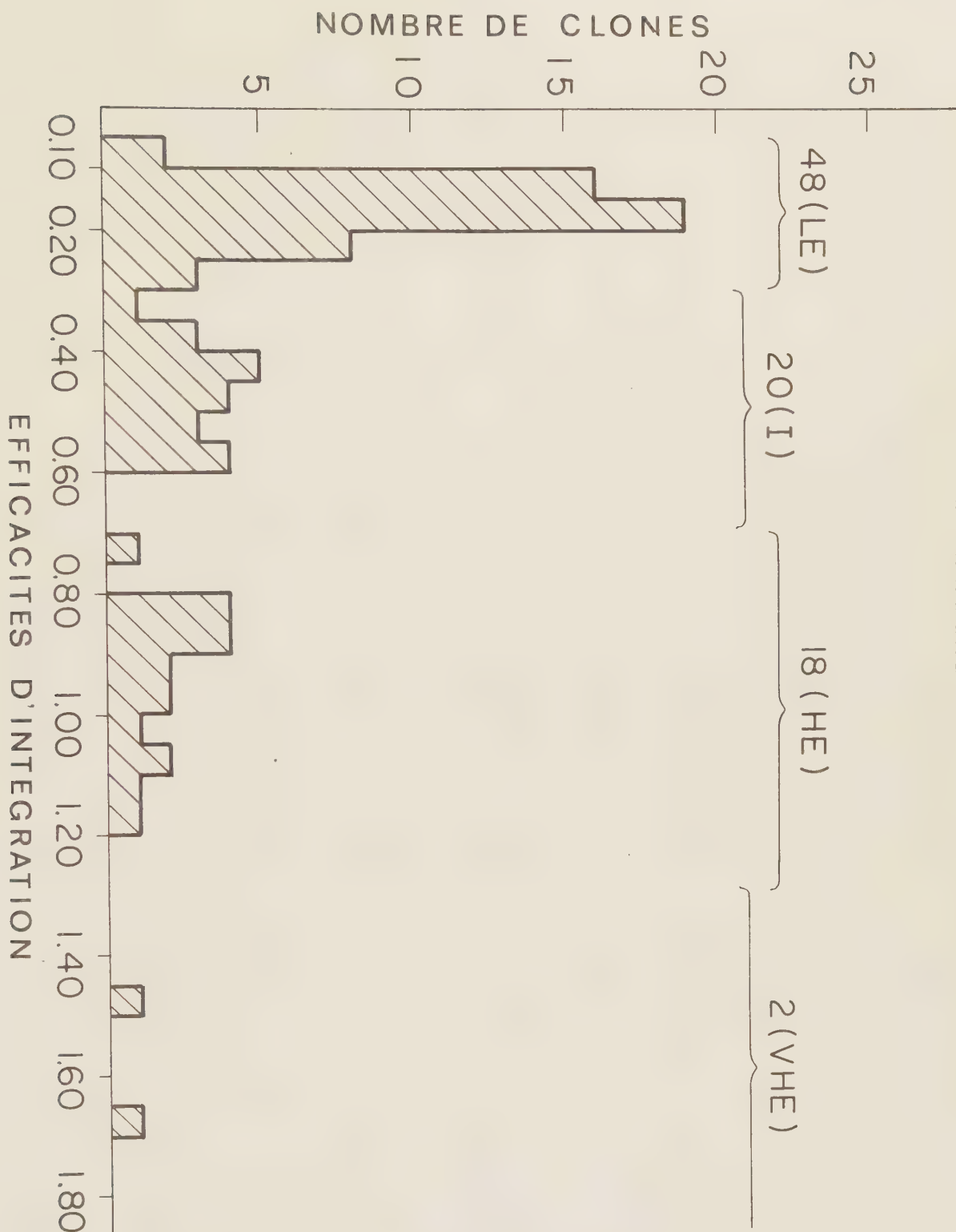


Figure 10 - DISTRIBUTION DES EFFICACITES D'INTEGRATION DE MUTATIONS SPONTANÉES Ami-A ISOLÉES DANS 401.

Chaque barre représente le nombre de mutations dont les efficacités sont comprises dans un intervalle de 0,01. Les crochets indiquent les classes faible efficacité (LE), efficacité intermédiaire (IE), forte efficacité (HE) et très forte efficacité (VHE), ainsi que le nombre des mutations distinctes dans chacune d'elles.

TABLEAU 9
CALCUL DU χ^2 POUR LES DEUX DISTRIBUTIONS DES EFFICACITES D'INTEGRATION DES MUTANTS
AMI A ISOLES DANS Cl_3 ET 401

Détermination :	0	C	O-C	$(O-C)^2$	$(O-C)^2/E$
Cl_3					
LE	46	51,14	-5,14	26,42	0,52
IE	9	15,78	-6,78	45,97	2,91
HE et VHE	50	38,08	11,92	142,09	3,73
401					
LE	48	42,86	5,14	26,42	0,62
IE	20	13,22	6,78	45,97	3,48
HE et VHE	20	31,92	-11,92	142,09	4,45
					$(\chi^2 = 15,71)$

Les nombres mentionnés ici sont pris des figures 9 et 10 . Les nombres des deux classes les plus efficaces sont groupés ensemble, le nombre des mutants de la classe VHE dans 401 étant inférieur à 5. 0, observé ; C, calculé. Pour deux degrés de liberté, la probabilité, dans ces conditions, d'obtenir un χ^2 aussi grand ou plus grand que 15,71 est inférieur à 0,5 %. En conséquence, les deux distributions sont différentes.

apparaissant pendant la transformation. Les mutations les moins efficaces, dont la caractéristique structurale pourrait être reconnue et éliminée uniquement dans la souche discriminante, seraient, pour cette raison, moins nombreuses dans la souche Cl_3 que dans la souche 401. En conséquence, le taux de mutations spontanées pour les mutants $Ami-r$ devrait être plus élevé dans la souche non-discriminante. Et en effet cette prévision s'est avérée correcte, comme nous l'avons montré par la mesure des taux de mutation pour les mutants spontanés résistants à l'aminoptérine, dans les deux souches.

TAUX DE MUTATION SPONTANEE POUR LES MUTANTS $Ami-r$.

Le nombre de mutants résistants à l'aminoptérine présents dans une série de cultures de Cl_3 ou 401 est déterminé dans des expériences indépendantes différant les unes des autres par le temps d'incubation des cellules. Pour chacune des deux souches 401 et Cl_3 la courbe déterminée par les valeurs du nombre de mutants $Ami-r$ et du nombre correspondant de cellules, est une droite en coordonnées logarithmiques (figure 11). Les deux courbes, bien que parallèles, sont tout à fait distinctes. Les taux de mutation estimés par la méthode graphique de LURIA et DELBRUCK (72) à partir de ces droites sont trois fois plus élevés dans la souche 401 que dans la souche Cl_3 . Afin de confirmer ce résultat, nous avons également mesuré les taux de mutations par la méthode de NEWCOMBE (83). Les deux souches poussent de la même façon sur la surface des boîtes. Cependant, la souche 401 donne plus de mutants $Ami-r$ capables de former des colonies après la sélection par l'aminoptérine que ne le fait la souche Cl_3 dans le même intervalle de temps (figure 12). Les valeurs des taux de mutations estimées par les deux méthodes sont indiquées dans le tableau 10.

Tableau 10. TAUX DE MUTATIONS SPONTANEEES $Ami-r$ DANS LES SOUCHES Cl_3 et 401

Méthodes	Taux de mutation des souches	
	Cl_3	401
Newcombe	10^{-6}	3×10^{-6}
Newcombe	$1,4 \times 10^{-6}$	$4,2 \times 10^{-6}$
Luria et Delbruck	10^{-6}	$3,2 \times 10^{-6}$

Les valeurs déterminées par la méthode de LURIA et DELBRUCK (72) sont estimées par la méthode graphique à partir d'un point pris sur une des deux courbes de la figure 11.

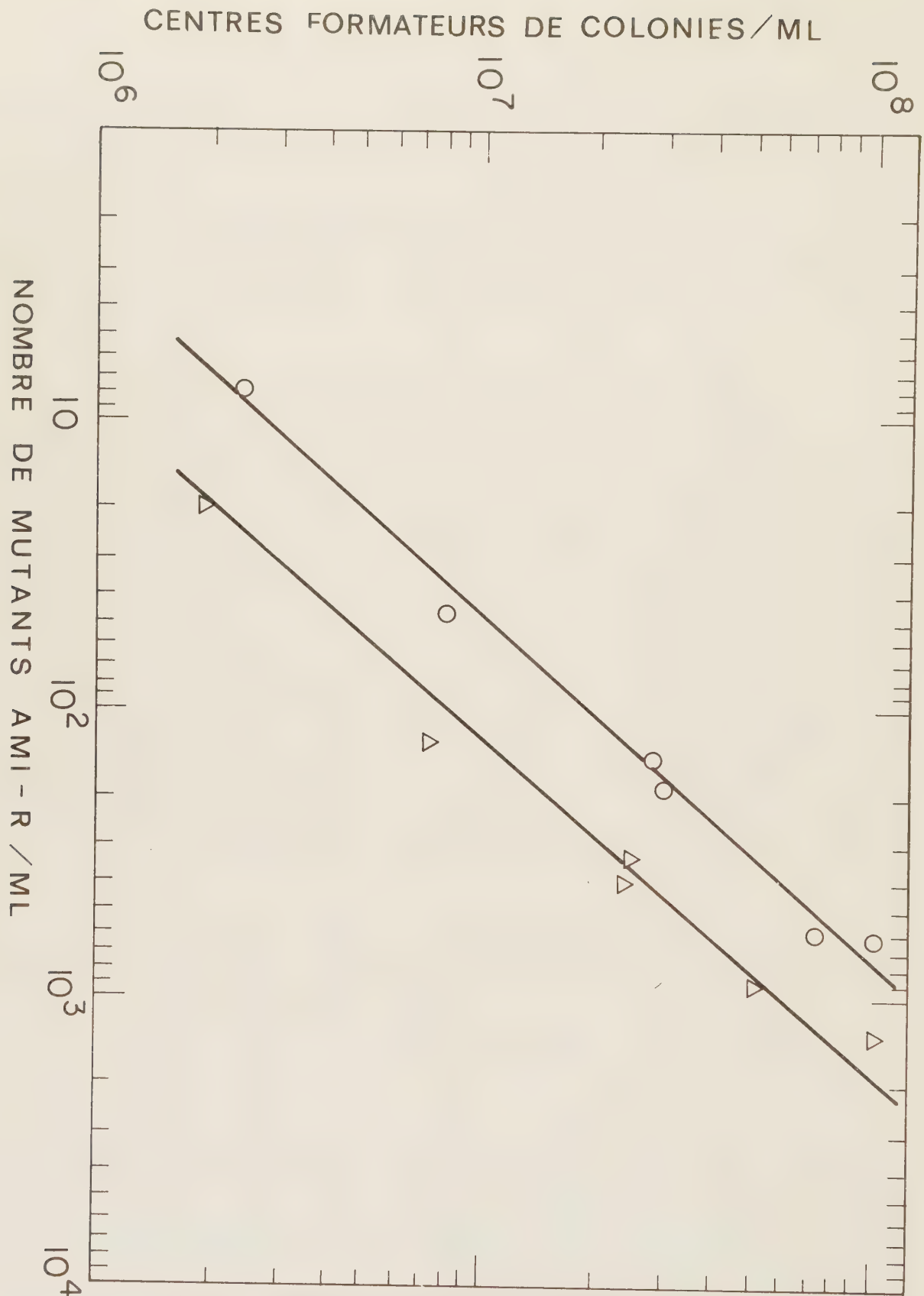


Figure 11- FREQUENCE MOYENNE DES MUTANTS Ami-r DANS LES CULTURES DE Cl_3 ET 401.

Chaque point représente le nombre moyen de mutants Ami-r dans 25 cultures indépendantes ayant atteint la même densité de cellules. $\bigcirc Cl_3$ $\triangle 401$

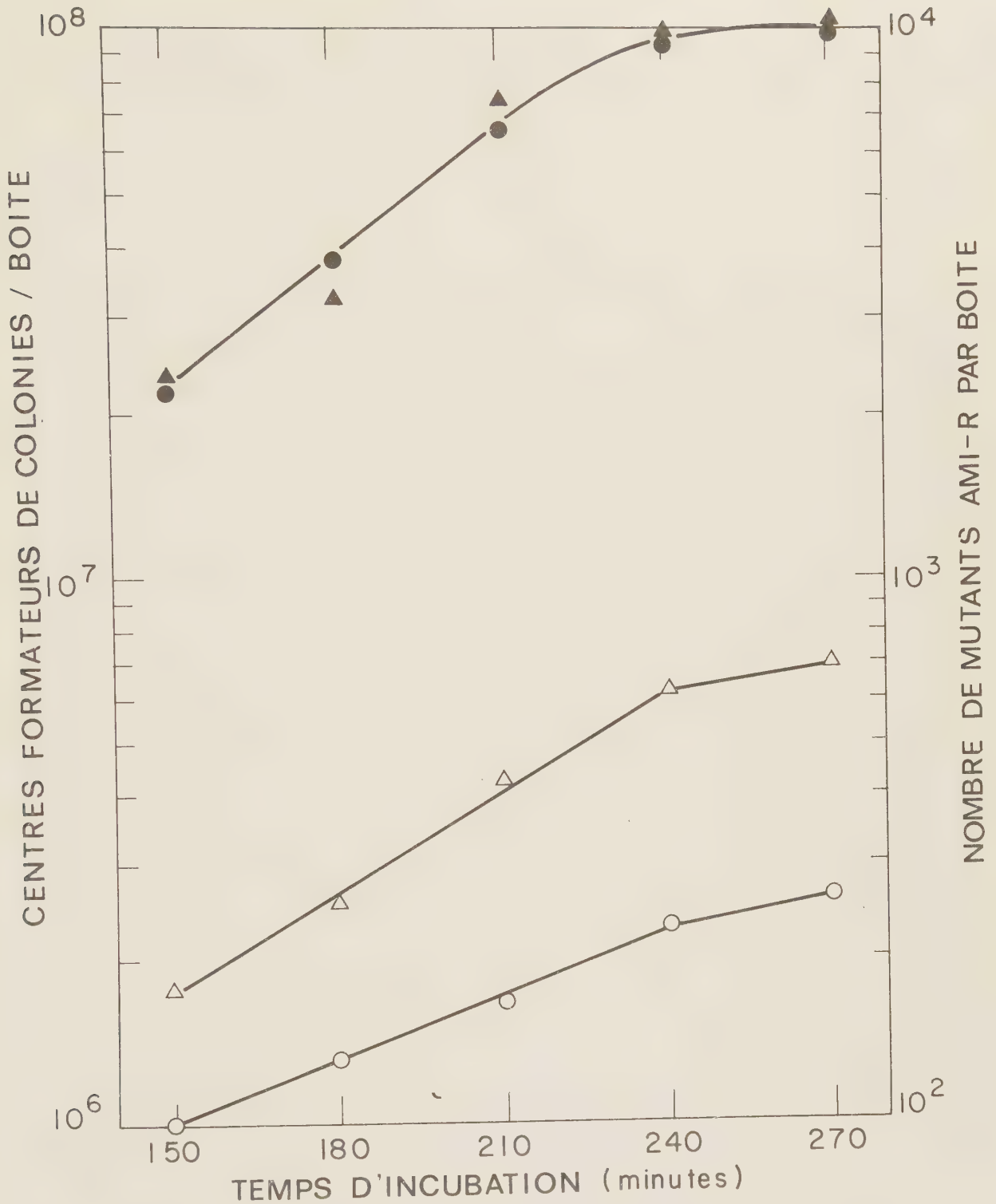


Figure 12 - CINETIQUE D'APPARITION DES MUTATIONS Ami-r DANS LES SOUCHES Cl₃ ET 401.

L'augmentation des nouvelles colonies Ami-r en fonction du temps est indiquée par les symboles ouverts, cercle: Cl₃, triangle: 401. Les symboles pleins représentent l'augmentation correspondante du nombre de centres formateurs de colonies.

Ces valeurs sont compatibles avec une augmentation d'environ un facteur trois du taux de mutation pour la résistance à l'aminoptérine dans la souche 401.

DISCUSSION

D'après leurs efficacités d'intégration individuelles, les mutations spontanées apparaissant dans le locus *ami A* se groupent en quatre classes. Les mutations à forte efficacité sont intégrées avec la même fréquence que le marqueur de référence *str-r 41*, alors que les mutations à faible efficacité sont intégrées avec environ un huitième de cette fréquence. Les mutations avec des efficacités intermédiaires se trouvent entre ces deux classes. La dernière classe correspond à des mutations avec de très fortes efficacités d'intégration. Les mutants de la classe à faible efficacité et de la classe à forte efficacité, apparus dans la souche discriminante, sont égaux en nombre et sont prédominants sur les mutants des deux autres classes. EPHRUSSI-TAYLOR, SICARD et KAMEN (26) et GRAY et EPHRUSSI-TAYLOR (40) n'ont trouvé que des mutations à forte efficacité et à faible efficacité avec les mêmes mutants *ami A* et la même souche réceptrice. L'absence des deux classes additionnelles peut être expliquée par le fait que ces auteurs n'ont pas examiné assez de mutants d'origine spontanée pour être capables de discerner ces quatre classes. De plus la majorité de leurs mutants *ami A* ont été induits par des mutagènes spécifiques de la seule classe à faible efficacité

Une distribution des mutations (*mal⁻*) au locus amyloamylase en quatre classes d'efficacité a été rapportée par LACKS (58). Il a exprimé les efficacités en termes du marqueur *sulf-d*, qui lui-même montre une intégration de 1,7 par rapport à *str-r 41*. Lorsque les efficacités des mutants *ami A* sont divisées par ce facteur afin de comparer les résultats, les quatre classes semblent être identiques dans les deux cas. Cependant, les classes rapportées ici ne sont pas aussi distinctes que celles observées par LACKS (58). Cette différence pourrait être reliée au fait que seuls les mutants *mal⁻*, considérés par des analyses génétiques comme étant des mutations ponctuelles ont été retenus par LACKS, alors que les mutants *ami A* incluent tous les types de mutations comme par exemple les mutations ponctuelles, multisites ou les délétions. Et en effet, il a été observé que certains de ces mutants, spécialement ceux de la classe intermédiaire, ségrègent après transformation, au moins, deux mutations séparables possédant des efficacités d'intégration différentes (GASC et SICARD, résultat non publié). Ces mutations multisites dont on a montré que les efficacités variaient dans un large spectre continu (58), tendent vraisemblablement à élargir la distribution.

Les mutations conférant la résistance à l'améthoptérine ont été séparées

en quatre groupes distincts d'après le même critère des efficacités différentielles par SIROTNAK et HACHTEL (108). Une comparaison directe de leurs données et celles obtenus avec les mutants *ami A* n'est pas possible puisque ces chercheurs ont utilisé un marqueur de référence différent de *str-r 41*. Néanmoins, après examination des différences relatives observées entre leurs classes et celles rapportées ici, il apparaît que les classes pourraient être identiques dans les deux cas.

La distribution des efficacités d'intégration, trouvée pour les mutations spontanées de résistance à l'érythromycine ou à la streptomycine n'est pas aussi caractéristique que celle des divers marqueurs que nous venons de mentionner (13 - 54). En plus du manque de classes discernables, la distribution des efficacités des mutants *str-r*, par exemple, montre une variation de 1 à 500 entre les mutations les moins efficaces et les plus efficaces (13). Un tel résultat pourrait être expliqué par la fréquence inhabituellement élevée des mutations multisites parmi ces mutants (98). Cependant l'analyse de 20 mutations indépendantes *ery-r* (0,5 µg/ml) apparues spontanément dans la souche Cl₃ pourrait fournir une autre explication. Selon leurs efficacités relatives au marqueur de référence *str-r 41*, toutes ces mutations se groupent dans les classes définies pour les mutants *ami A* : forte efficacité, 12 ; efficacité intermédiaire, 2 ; faible efficacité, 6 (113). La dissimilarité entre cette dernière observation et les résultats de RAVIN et de ses collaborateurs semble être dû à des différences dans les souches utilisées. L'importance du génotype des souches est mise en évidence par l'observation que deux souches isogéniques (Cl₃ et 401) donnent naissance à des mutations spontanées *ami A* dont la distribution des efficacités est significativement différente dans l'une et l'autre souche. La distribution des efficacités des mutations *ami A* apparaissant dans 401, montre qualitativement les mêmes quatre classes que celles trouvées dans Cl₃. Cependant les fréquences des mutants appartenant aux deux classes les plus efficaces et aux deux classes les moins efficaces sont significativement différentes dans les deux souches. Le nombre de mutants des deux classes les moins efficaces est, dans 401, beaucoup plus élevé que celui des mutants des deux autres classes, alors ces nombres sont égaux dans Cl₃. Cette observation peut être reliée au fait que la souche non discriminante 401 possède un taux de mutation plus élevé pour les mutants résistants à l'aminoptérine et pour les mutants résistants à l'ophtochine (III) que dans la souche discriminante Cl₃. Une hypothèse plausible est que le mécanisme qui élimine certaines classes de transformées dans la souche discriminante élimine aussi une fraction des mutations spontanées. Comme conséquence d'une mutation, ce mécanisme agissant dans la transformation et la mutation serait inactivé dans la souche 401.

L'observation de l'augmentation des taux de mutations spontanées dans les souches *hex⁻* par rapport aux souches *hex⁺* sera étendue à d'autres mutations dans des loci différents, pour les souches isogéniques R6 (*hex⁺*) et R6X (*hex⁻*), sou-

ches distinctes de Cl_3 et 401. Le résultat de cette étude est présenté dans le chapitre suivant.

CHAPITRE IV

ACTION DU SYSTEME DE DISCRIMINATION AU COURS DE LA TRANSFORMATION
ET DE LA MUTAGENESE SPONTANEE

Nous avons vu dans le chapitre II que les différences entre les efficacités d'intégration de divers marqueurs étaient réduites dans la souche 401. Cependant, les efficacités des marqueurs LE, n'atteignent jamais, dans cette souche, la valeur des efficacités des marqueurs HE. C'est ainsi que l'efficacité du marqueur *opt-r 2*, par exemple n'est que la moitié de celle du marqueur de référence *str-r 41*. Or rapidement, nous avons constaté qu'une autre souche non discriminante de pneumocoque, la souche Rx (voir chapitre V, 93), intégrait le marqueur *opt-r 2*, ainsi d'ailleurs que les autres marqueurs LE examinés, avec rigoureusement la même efficacité que le marqueur *str-r 41* ou que d'autres marqueurs HE. Puisque d'après cette observation, le processus de discrimination semblait mieux bloqué dans la souche Rx que dans la souche 401, nous avons décidé d'utiliser cette souche Rx. Afin de pouvoir comparer des souches isogéniques, la mutation de la souche Rx responsable de la perte de la capacité à discriminer a été introduite par transformation dans la souche discriminante standard R6 que nous utilisions à ce moment-là. La souche ainsi construite R6X et la souche R6 seront utilisées pour pratiquement toutes les recherches dont les résultats seront présentés dans ce chapitre et dans les chapitres suivants (à l'exception du chapitre X). L'avantage décisif de ces souches provient en outre du fait qu'elles peuvent être rendues compétentes très facilement et pendant des durées pouvant excéder deux heures.

Dans ce chapitre, nous décrirons l'isolement de la souche R6X et son comportement vis-à-vis de l'efficacité des marqueurs. Puis nous présenterons les résultats d'une recherche plus complète que dans le chapitre précédent, sur l'action du processus de discrimination au cours de la mutagenèse spontanée.

MATERIELS ET METHODES

Souches bactériennes : Le sous clone 6 (R6) dérivé de la souche R 36 A a été utilisé comme souche réceptrice (figure 18, chapitre V). Le DNA des souches non discriminantes Rx (93) et Hex-1 (59) a servi pour introduire, par transformation, la mutation *hex*⁻ dans la souche R6. La souche 119, source du DNA

donateur, a été construite par transformations successives de R6. Cette souche porte les marqueurs conférant la résistance à : la sulfanilamide, *sulf-d* (51), la streptomycine, *str-r* 41 (98) ; l'acide fusidique, *fus-r* A ; la novobiocine, *nov-r* 1 (12) ; l'optochine, *opt-r* 2 (24) ; la rifampine, *rif-r* 23 ; la streptolydigue, *stg-r* F et à l'aminoptérine, *Thy*⁻*A*₂ (35) et *Thy*⁻*B*₁ (114) ces deux dernières mutations entraînant pour la souche une exigence de 10 µg en thymidine.

ISOLEMENT DE L'ADN MARQUE AU TRITIUM : Les cellules de la souche 119 sont mises à incuber jusqu'à une densité de 5×10^8 centres formateurs de colonies par ml dans 10 ml du milieu M (115 et chapitre X) contenant 250 µ Ci de (méthyle - ³H) thymidine. Les cellules sont collectées, lavées 2 fois à 4°, et remises en suspension dans 1 ml de 0,15 M NaCl - 0,01 M EDTA (pH 8,0). Après la lyse des cellules obtenue par l'addition de 0,02 % de dodecyl sulfate de sodium et 0,01 % de désoxycholate de sodium, 200 µg de ribonucléase pancréatique (Worthington) et 200 unités de ribonucléase T₁ (Worthington) sont ajoutées. Après 1 heure d'incubation à 37°, on ajoute 400 µg de pronase (Calbiochem), chauffé au préalable à 60° pendant 10 minutes puis le lysat est incubé pendant 6 heures à 45°. Après la précipitation à l'alcool, les fibres de DNA sont retirées et dissoutes dans 3 ml d'une solution 20 mM NaCl- 2 mM citrate de sodium.

MESURE DE L'EFFICACITE D'INTEGRATION DES MARQUEURS : Le DNA de la souche 119 marqué par le tritium est ajouté à environ 10^8 centres formateurs de colonies/ml de cellules compétentes préparées le jour même (46) et des échantillons, prélevés à des moments différents, sont mélangés avec un volume égal de milieu B préchauffé (43) contenant 50 µg/ml de désoxyribonucléase I (Worthington) et 1 mM d'acétate de magnésium. Après 5 minutes d'incubation à 37°, des fractions de 4 ml sont collectées sur des membranes filtres (Millipore), lavées trois fois avec une solution 0,15 M NaCl - 0,015 M Na citrate et trois fois avec 5 % d'acide trichloroacétique. Les filtres sont alors séchés et la radioactivité est comptée dans du Liquasol (New England Nuclear Corp) dans un spectromètre à scintillation liquide. Les fractions restantes sont diluées au cinquième et incubées à 37° pendant 2 heures. Le nombre de transformées pour chaque marqueur est déterminé par étalement en milieu gélosé contenant les antibiotiques appropriés : 75 µg/ml de sulfanilamide, 200 µg/ml de streptomycine, 50 µg/ml d'acide fusidique, 4 µg/ml de novobiocine, 2 µg/ml d'optochine, 1 µg/ml de rifampine, et 5 µg/ml de streptolydigue. Les transformées pour le marqueur *thy*⁻*A*₂ sont sélectionnées par 4 µg/ml d'aminoptérine en présence de 50 µg/ml de thymidine

Mesure des taux de mutations spontanées : Les taux de mutations sont mesurés pour les souches R6 *str-r* 41 *nov-r* 1 et R6x *str-r* 41 *nov-r* 1. Une culture en phase exponentielle est diluée dans 100 ml de milieu préchauffé jusqu'à une den-

sité finale d'environ 10^3 cellules par ml puis distribuée dans 100 petits tubes, et incubée à 37°. Quand une densité cellulaire suffisante est atteinte, le contenu de chaque tube est versé dans une petite boîte de pétri et mélangé avec 5 ml de milieu M contenant 1,5 % d'agar et un des antibiotiques. Après 24 heures d'incubation, le nombre des boîtes ne contenant aucune colonie est déterminée. Le nombre moyen de bactéries est estimé par comptage direct au microscope à partir de six tubes différents à l'aide d'une chambre de Petroff-Hauser. La méthode P(o) de LURIA et DELBRUCK (72) est utilisée pour calculer les taux de mutations.

Pour une mutation affectant un caractère donné, le taux de mutation est estimé d'abord à partir de 25 cultures indépendantes poussées jusqu'à une densité élevée, cela afin de déterminer la densité de cellules la plus appropriée pour la méthode P(o). Le taux de mutation est estimé graphiquement connaissant le nombre moyen de colonies résistantes par culture et le nombre de bactéries étalées (72).

Distribution de l'efficacité d'intégration des mutations spontanées :

Les cultures sont préparées à partir des colonies prélevées dans les boîtes utilisées pour l'estimation des taux de mutations spontanées. Afin d'exclure les mutations d'origine commune, une seule colonie est sélectionnée par boîte. Après plusieurs heures de croissance, les cellules contenues dans 10 ml de culture sont collectées par centrifugation et le culôt est remis en suspension dans 1 ml d'une solution 0,1 M Tris HCl - 0,01 M EDTA - 0,1 % désoxycholate de sodium. Après 10 minutes à 37° pour permettre la lyse des cellules, le DNA est précipité avec 2 ml d'alcool. Les fibres sont récupérées et dissoutes dans une solution 20 m M NaCl - 2 m M Na citrate. Les activités transformantes de ces DNA sont alors déterminées. Le marqueur *str-r 41* présent dans tous les DNA est utilisé comme marqueur de référence pour établir les efficacités des autres marqueurs.

Sources des antibiotiques : Le sulfate de streptomycine a été acheté chez Eli Lilly and Co, Indianapolis et l'aminoptérine chez Nutritional Biochemical Corp, Cleveland. La streptolydigin a été fournie gracieusement par Upjohn Co, Mich. L'acide fusidique est un don de Leo Pharmaceutical Products, Ballerup, Denmark et la rifampine est un don de Ciba Pharmaceutical Co, N. J.

RESULTATS

Isolement de souches hex^- isogéniques avec la souche R6.

Bien que R6 la souche standard discriminante (hex^+) et Rx la souche non-discriminante (93) dérivent du même parent R 36 A (figure 18, Chapitre V), elles ont

évolué différemment. Dans le but de faire une comparaison directe des deux phénotypes, nous avons introduit par transformation la mutation responsable de la perte de discrimination de la souche Rx dans la souche R6.

L'irradiation du DNA transformant par la lumière ultraviolette conduit à une diminution de l'activité biologique du DNA. Lorsque la souche discriminante R6 est utilisée comme réceptrice, l'activité transformante des marqueurs LE est perdue beaucoup plus rapidement que celle des marqueurs HE (26 - 112 -). Lorsque la souche non discriminante Rx est utilisée comme réceptrice, les activités transformantes des marqueurs LE et HE diminuent au même taux que l'activité des marqueurs HE dans la souche R6 (Figure 13) (116). Ce fait qui permet de distinguer les souches hex^- et hex^+ a été exploité pour reconnaître le transfert du phénotype hex^- dans la souche R6.

Les bactéries compétentes de la souche R6 sont mises en contact avec le DNA isolé à partir de Rx et sont incubées pendant suffisamment de temps pour permettre plusieurs générations. Ces bactéries (R6 transformé) ainsi que les cultures contrôlées de R6 et Rx non exposées au DNA, sont rendues compétentes et mises en contact avec du DNA irradié par la lumière ultraviolette et renfermant les marqueurs *str-r 41* (HE) et *nov-r 1* (LE). Les bactéries sont étalées en milieu sélectif après une expression de phénotype en liquide pendant 2 heures. La souche réceptrice Rx donne le même nombre de transformées pour les deux marqueurs alors que la souche R6 non traitée avec le DNA de Rx donne environ 10^4 fois plus de transformées *str-r 41* que *nov-r 1*. Les bactéries de la souche R6 qui ont été transformées avec le DNA de Rx montrent seulement un excès de 30 fois des transformées *str-r 41*. 20 colonies correspondant à des transformées *nov-r 1* sont prélevées et les clones sont examinés par transformation avec du DNA porteur des marqueurs *str-r 41* (HE) et *stq-r F* (LE) afin de déterminer leur capacité de discrimination. Parmi les transformées *nov-r 1* provenant des bactéries R6 transformées avec du DNA Rx, dix-neuf ont perdu la propriété de discriminer (hex^-), tandis que toutes les transformées *nov-r 1* provenant de la culture contrôle R6, retiennent leur phénotype hex^+ . La fréquence des bactéries ayant acquis le phénotype hex^- dans la culture traitée avec le DNA Rx est environ 3 %, ce qui est le niveau habituellement obtenu pour un seul marqueur HE. Au vu de cette efficacité élevée avec laquelle le marqueur est transféré par transformation, il semble peu probable que plus d'une mutation soit responsable de la propriété hex^- . En utilisant une autre souche non discriminante nous avons également montré que la perte de la capacité à discriminer est la conséquence d'une seule altération. Par le même procédé nous avons isolé d'autres transformées R6 hex^- après transformation de R6 par du DNA d'une autre souche non discriminante, la souche Hex-1. Un clone appelé R6H, isolé par transformation de R6 avec du DNA Hex-1, et un clone, appelé R6x, isolé par transformation de R6 avec du DNA Rx seront maintenant examinés dans les paragraphes suivants.

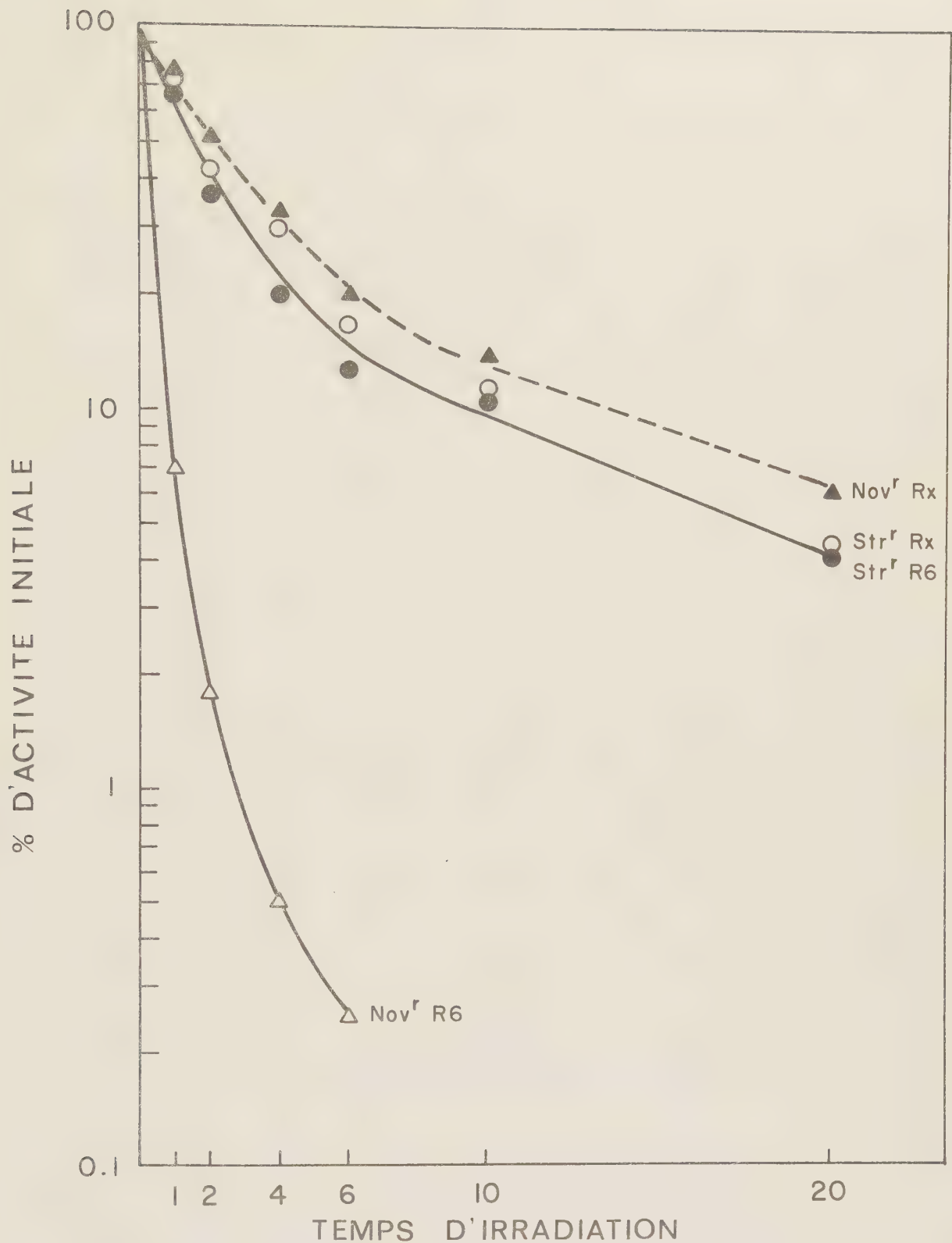


Figure 13 - INACTIVATION DES MARQUEURS *nov-r1* (LE) ET *str-r41* (HE) PAR IRRADIATION DU DNA A LA LUMIERE ULTRAVIOLETTE.

L'irradiation est effectuée avec une lampe germicide G.E de 15W à la distance de 33 cm. L'activité transformante est mesurée dans les souches R6 et RX. L'efficacité d'intégration de *nov-r1* est 1 dans RX et 0,1 dans R6. Δ *nov-r* R6; $\circ$ *str-r* R6; $\bullet$ *str-r* RX; $\blacktriangle$ *nov-r* RX.

Efficacités d'intégration de divers marqueurs dans les souches

R6 et R6x

Le nombre de transformées pour une grande variété de marqueurs ainsi que le nombre de transformées correspondant à une quantité donnée de DNA absorbé par les cellules compétentes, sont comparées dans les souches hex^- R6x et R6H et dans la souche parentale hex^+ R6.

La transformation est effectuée à une densité bactérienne de 10^8 C. F. U. par ml avec du DNA isolé à partir de la souche 119 portant les marqueurs LE, *stg-r F*, *rif-r 23*, *nov-r 1*, *opt-r 2* et *thy A₂*, deux marqueurs HE, *str-r 41*, *fus-r A*, et un marqueur VHE *sulf-d* (tableau 11).

La souche hex^+ donne des fréquences de transformation qui varient d'un facteur 1 à 20, alors que les souches non discriminantes donnent pratiquement la même fréquence pour tous les marqueurs examinés.

En utilisant du DNA de la souche 119 marqué au tritium, nous avons déterminé le nombre des transformées en fonction de la quantité de DNA fixé par les souches hex^+ et hex^- (figure 14).

Les transformées augmentent proportionnellement à la quantité de DNA fixé. Pour une quantité donnée de DNA donateur, le nombre de transformées *sulf-d* (très forte efficacité) est à peu près identique dans les deux souches. Le marqueur *str-r 41* (HE) est introduit avec environ 2/3 de l'efficacité du marqueur *sulf-d* dans la souche hex^+ . Le marqueur à faible efficacité *stg-r F* est introduit avec moins du dixième de l'efficacité du marqueur *sulf-d* dans la souche R6 et avec une égale efficacité dans la souche R6X. L'altération hex^- provoque une augmentation très marquée de l'efficacité avec laquelle les marqueurs LE sont transférés, et une augmentation plus réduite de l'efficacité des autres marqueurs. C'est ainsi que l'augmentation modérée de l'efficacité du marqueur *str-r 41* est largement responsable de l'abaissement apparent de l'efficacité de *sulf-d* observé dans la souche hex^- (tableau 11). Ce qui est vraisemblablement une simple différence mutationnelle, induit la perte de la capacité de discriminer contre les marqueurs LE.

TAUX DE MUTATIONS SPONTANÉES DANS LES SOUCHES R6 ET R6X.

Le taux des mutations spontanées dans le locus *ami A* est plus élevé dans la souche non discriminante 401 que dans la souche Cl₃. Nous avons voulu savoir si cette augmentation était générale aux souches hex^- . Dans ce but nous avons estimé les taux de mutations spontanées pour plusieurs loci dans les deux souches R6 et R6X (tableau 12).

Les taux de mutations sont substantiellement plus élevés dans la souche hex^- R6x que dans la souche hex^+ R6. La souche R6H manifeste aussi la même haute mutabilité que R6x pour la résistance à la streptolydigue, seul type de mutation examiné.

TABLEAU 11

EFFICACITES D'INTEGRATION DES DIVERS MARQUEURS DE LA SOUCHE 119 MESUREES DANS LES SOUCHES RECEPTRICES
R6, R6X et R6H

Marqueurs de résistance à un antibiotique	R6		R6X		R6H		
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	
Streptomycine :	<i>str-41</i>	195	1,0	230	1,0	310	1,0
Sulfanilamide :	<i>sul-f-d</i>	350	1,8	290	1,2	395	1,3
Acide fusidique :	<i>fus-r4</i>	275	1,4	270	1,2	315	1,0
Novobiocine :	<i>nov-r1</i>	23,0	0,12				
Optochine :	<i>opt-r2</i>	37,0	0,19	280	1,2	335	1,1
Streptolydigne :	<i>stg-rF</i>	27,0	0,14	285	1,2	350	1,1
Rifampine :	<i>rif-r23</i>	41,0	0,21	250	1,1	365	1,2
Aminoptérine :	<i>thy-A2</i>	17,5	0,09	205	0,9	390	1,3

(1) Nombre de transformées /ml x 10⁴
(2) Efficacité d'intégration (rapport du nombre de transformées pour un marqueur donné
au nombre de transformées pour le marqueur *str-r 41*

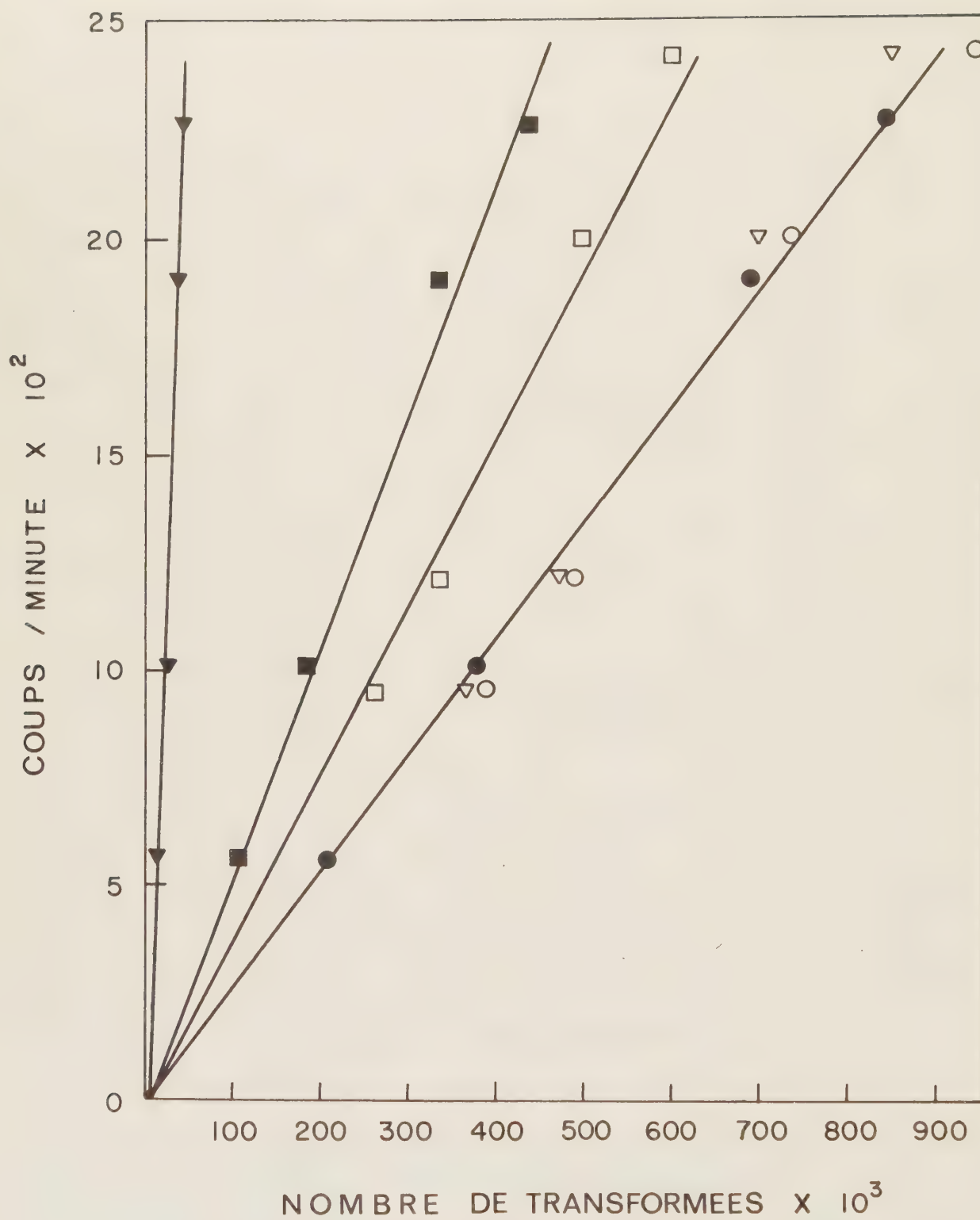


Figure 14 - EFFICACITE DE TRANSFORMATION DE DIVERS MARQUEURS DANS LES SOUCHES R6 ET R6X.

Symboles fermés R6; symboles ouverts R6X. Triangles *stg-rF*; carrés *str-r41*; cercles *sulf-d*.

TABEAU 12
TAUX COMPARATIVES DES MUTATIONS SPONTANÉES

Loci	Taux de mutation		
	R6 (hex ⁺) (10 ⁻⁸)	R6X (hex ⁻) (10 ⁻⁷)	$\frac{\text{hex}^-}{\text{hex}^+}$
Rifampin (10 µg/ml)	3,7 (58/78) 1,2 (25/25)	1,4 (12/80) 0,60 (25/25)	4 5
Streptolydigin (15 µg/ml)	0,80 (52/80) 0,30 (25/25)	1,3 (37/80) 0,41 (25/25)	16 14
Acide fusidique (75 µg/ml)	0,35 (26/60) 0,23 (48/60)	0,64 (25/60) Φ 0,57 (12/60)	18 25
Optochine (2 µg/ml)	0,40 (39/60)	1,2 (24/60)	30
Thymidine ⁻ <i>thyA2</i> $\longrightarrow$	2,9 (25/25)	1,5 (25/25)	5
Thymidine ⁺	0,38 (53/60)	0,42 (23/60)	10
Thymidine ⁻ (50 µg/ml)	0,73 (41/60)	0,37 (32/60)	5
$\longrightarrow$ thymidine ⁻ (2-10 µg/ml) $\neq$	0,68 (45/60)	0,35 (6/59)	5

Les nombres entre parenthèses correspondent au nombre de tubes sans mutants et au nombre total de tubes. Lorsque 25 tubes sont examinés, les bactéries sont mises à pousser jusqu'à une densité élevée et les taux de mutations sont estimés graphiquement (72). Dans tous les autres cas les taux de mutations sont déterminés par la méthode du P(0) (72).

Φ R6H
 $\neq$ Les mutants exigeant 2-10 µg/ml de thymidine pour la croissance sont sélectionnés par étalement des bactéries Thy⁻ (50 µg/ml) dans un milieu contenant 10 µg/ml de thymidine et 4 µg/ml d'aminoptérine.

DISTRIBUTION DES EFFICACITES D'INTEGRATION DES MARQUEURS.

Si la différence dans les taux de mutations est vraiment due à l'élimination de la classe des mutants LE dans la souche hex^+ , nous nous attendrions à ce que les mutants HE soient relativement plus nombreux dans les souches hex^+ que parmi les souches hex^- .

Les classes d'efficacité des mutations apparues spontanément dans les souches hex^- et hex^+ sont indiquées dans les figures 15 - 16 - 17. La majorité des mutants résistants à la streptolydigin semble appartenir à la classe LE dans l'une ou l'autre souche. Parmi les mutants résistants à la rifampine, ceux de la classe HE sont relativement plus nombreux dans la souche hex^+ . Le cas le plus frappant est celui des mutants résistants à l'acide fusidique (figure 16). Dans ce cas, virtuellement tous les mutants apparus dans la souche hex^+ sont HE tandis que plus de la moitié de ceux apparus dans la souche hex^- sont LE. Il n'est pas possible d'établir une interprétation quantitative de ces observations, mais il semble certain que les mutants LE sont en effet plus nombreux parmi les mutants apparus dans la souche hex^- .

DISCUSSION

La souche R6x a perdu la capacité de discrimination entre des marqueurs LE et HE à la suite d'une seule mutation. Cette souche semble être déficiente pour l'endonucléase spécifique de certains mauvais appariements et elle intègre les marqueurs LE avec une forte efficacité.

Les souches R6 et R6x sont indistinguables dans leurs taux de croissance et leur sensibilité à la lumière ultraviolette ou aux agents alkylants comme la nitrosoguanidine ou le méthane sulfonate de méthyle (116). Le temps nécessaire pour redémarrer la croissance après l'exposition aux agents mentionnés plus haut est aussi identique dans les deux souches.

Le mécanisme de discrimination qui agit durant la transformation semble aussi intervenir dans la survie des mutants apparaissant spontanément. Nous venons de montrer que la souche non discriminante R6x manifeste un taux de mutations spontanées pour les loci examinés, supérieur à celui de la souche discriminante. Les différences observées varient entre 5 et 30 fois selon le locus examiné. Dans le chapitre précédent nous avons également observé que deux autres souches isogéniques, les souches Cl₃ et 401 possédaient des taux de mutations spontanées différents. Il est intéressant de remarquer que la différence des taux de mutations entre une souche hex^+ et une souche hex^- semble être plus grande dans le cas des souches R6

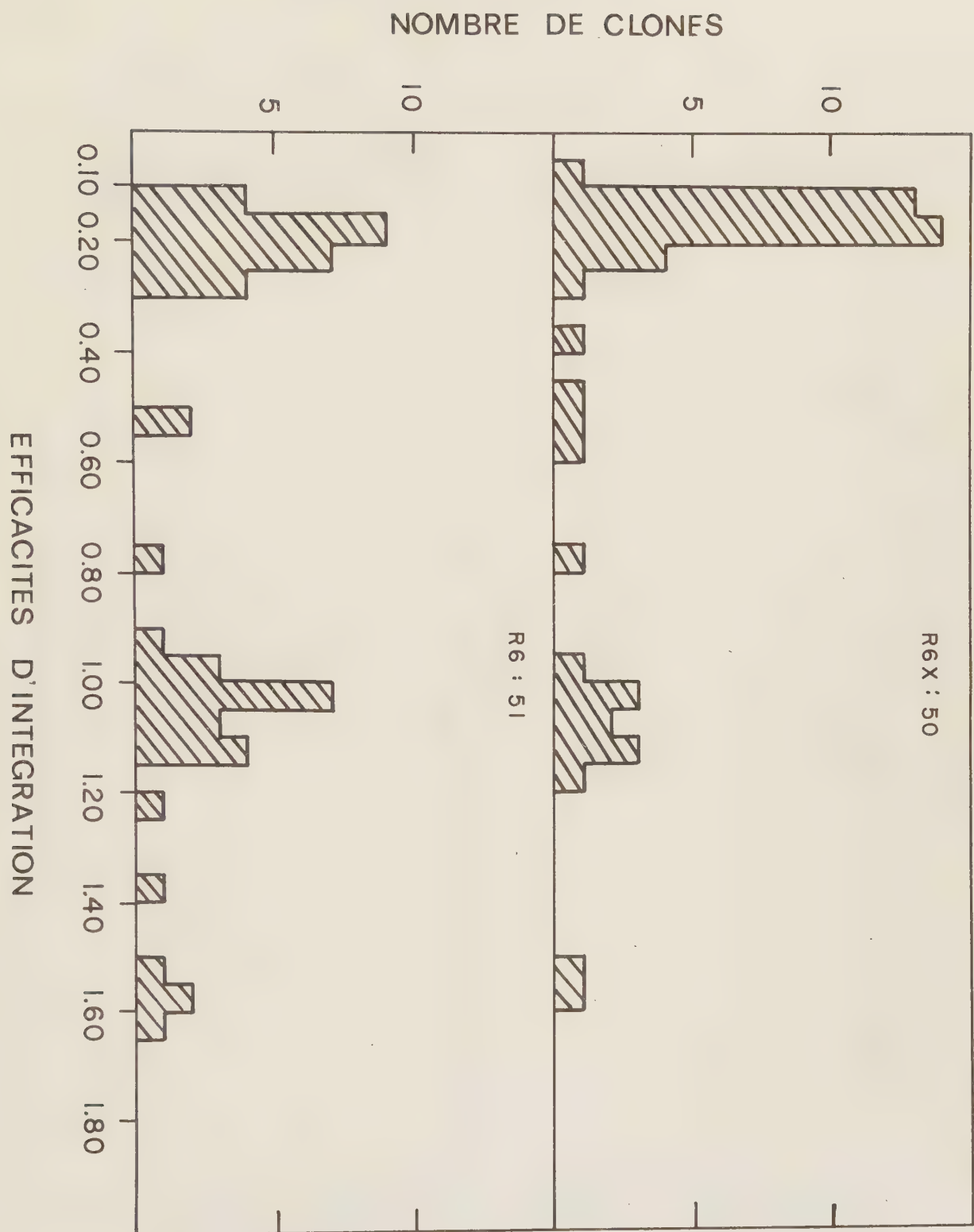


Figure 15- DISTRIBUTION DES EFFICACITES D'INTEGRATION DES MUTANTS SPONTANES RESISTANTS A LA RIFAMPINE.

(haut) R6X, 50 colonies; (bas) R6, 51 colonies.

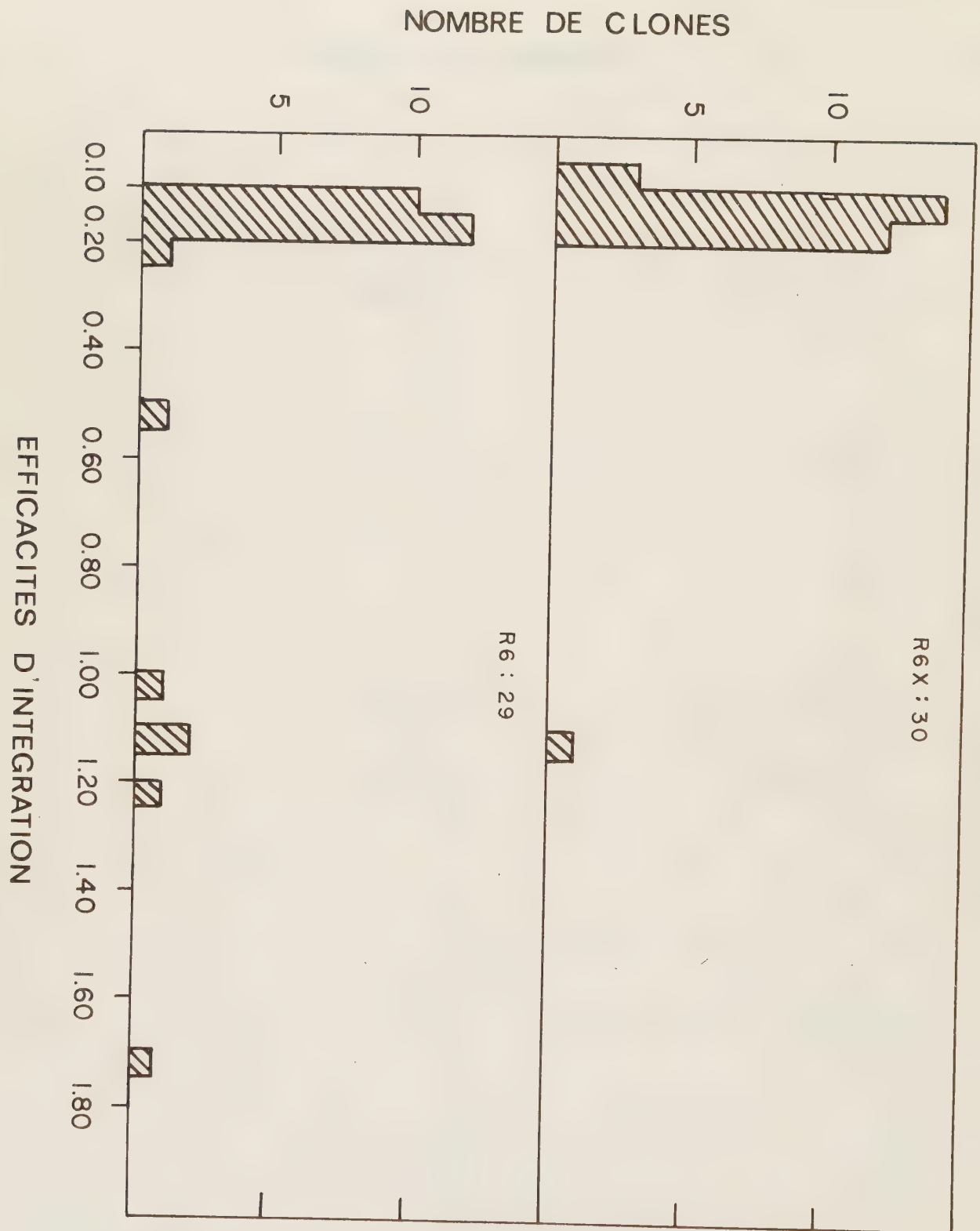


Figure 16 - DISTRIBUTION DES EFFICACITES D'INTEGRATION DES MUTANTS SPONTANES RESISTANTS A LA STREPTOLYDIGINE.

(haut) R6X, 30 colonies; (bas) R6, 29 colonies

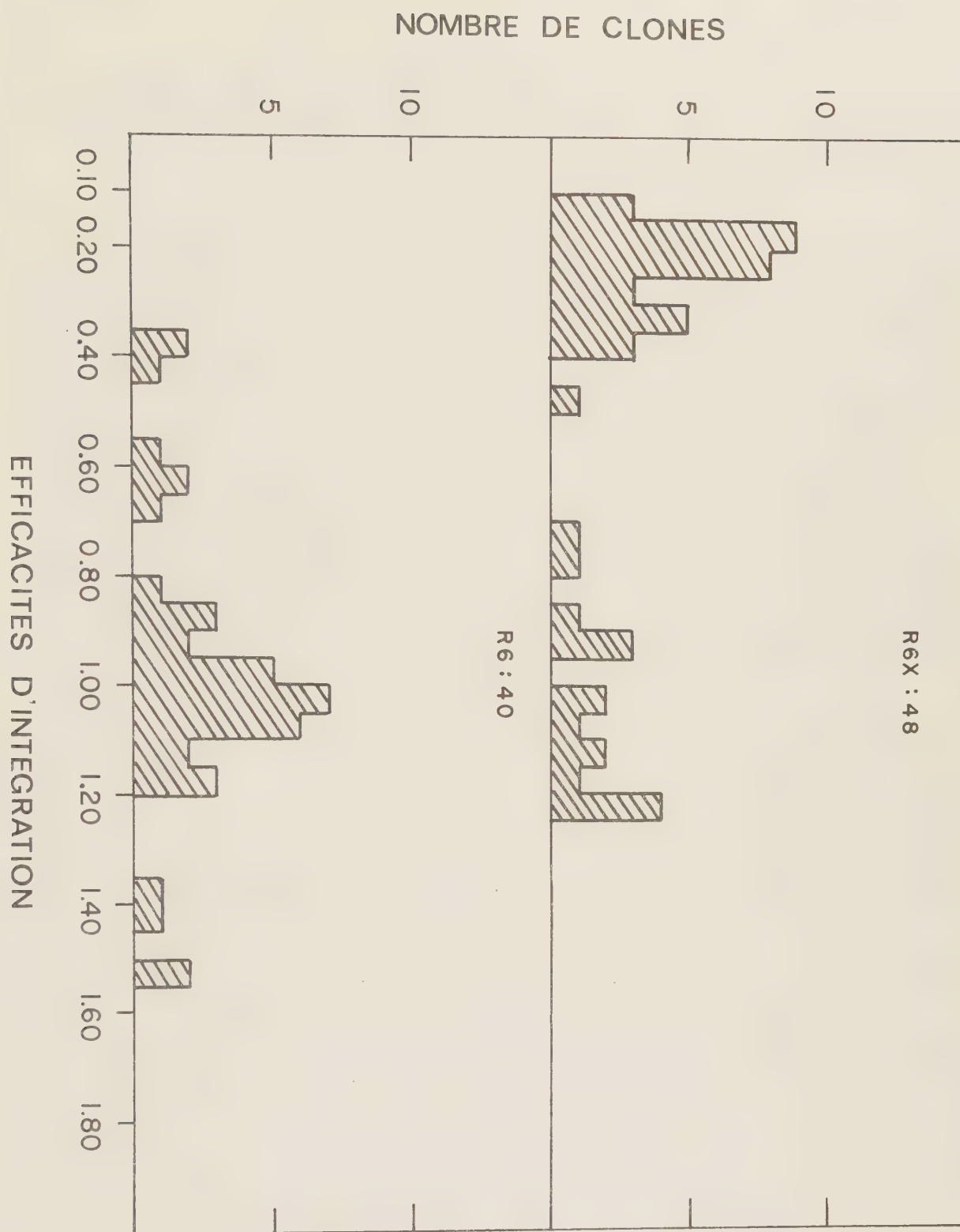


Figure 17 - DISTRIBUTION DES EFFICACITES D'INTEGRATION DES MUTANTS SPONTANES RESISTANTS A L'ACIDE FUSIDIQUE.

(haut) R6X, 48 colonies; (bas) R6, 40 colonies.

et R6x que dans le cas des souches Cl₃ et 401 (tableau 12 et tableau 10). Ceci pourrait être lié au fait que l'écart des efficacités pour une mutation LE donnée est lui-même plus important entre les souches R6 et R6x qu'entre les souches Cl₃ et 401.

La distribution des efficacités d'intégration des mutations indépendantes d'origine spontanée et appartenant à divers loci confirme la prévision que les mutations les moins efficaces devraient être moins nombreuses dans la souche discriminante que dans la souche non discriminante. Quoique ce soit difficile à quantifier, les différences dans les taux de mutations entre les deux souches pourraient être expliquées par l'élimination d'une fraction des mutations de la classe LE. Il doit cependant être remarqué que les mutations LE ne sont pas totalement absentes dans la souche discriminante.

La fonction responsable de la discrimination est pléiotrope en ce sens qu'elle est responsable de la réduction des taux de mutations spontanées et de l'élimination de certaines classes de transformées. Il apparaît comme probable que cette réduction est due à l'élimination d'une large fraction des produits des mutations spontanées. Les souches non-discriminantes peuvent ainsi être assimilées à des souches mutatrices (mutator strain).

CHAPITRE V

SATURATION DU PROCESSUS DE DISCRIMINATION

Bien que les études sur le problème de l'effet marqueur observé dans la transformation du pneumocoque aient été effectuées dans des laboratoires différents, toutes ont été réalisées avec des souches non capsulées très voisines qui dérivait du même parent, la souche D 39 S, une souche virulente, possédant une capsule de type II. C'est ainsi que toutes les souches qui ont été mentionnées jusqu'ici, telles les souches Cl₃, 401, R6 et R6X dérivent de la même souche R 36 A, elle-même issue par clonage de la souche D 39 S. Cette dernière souche qui a été isolée pendant la 1^{ère} guerre mondiale, chez un malade souffrant de pneumonie, a donné naissance à de nombreux sousclones notamment au cours des 30 dernières années. Il nous a paru intéressant de déterminer l'aptitude à discriminer chez tous les clones issus de D 39 S, que nous pouvions nous procurer. D'autre part, nous avons voulu savoir si cette aptitude était une caractéristique générale de tous les pneumocoques. Dans ce but, nous avons rendu compétentes et transformé les cellules de plusieurs souches de pneumocoque d'origines très diverses.

Nous avons obtenu des résultats expérimentaux nous permettant de répondre clairement à ces deux questions, mais aussi, grâce à ces études, nous avons découvert que la fonction hex pouvait être saturée par un DNA transformant non isogénique avec le DNA récepteur. C'est pourquoi nous introduirons, dans ce chapitre, la notion de souches homologues et de souches hétérologues. Deux souches de pneumocoques d'origines différentes seront considérées comme étant hétérologues, alors que deux souches de même origine mais ne différant que par un nombre limité de mutations seront dites homologues.

Pendant que ce travail était en cours, des observations similaires sur la saturation de la fonction hex par du DNA non isogénique, ont été présentées par GUILD et SHOEMAKER au congrès sur la transformation bactérienne à TAPOCO (Caroline du Nord, Etats Unis, Juin 1973).

MATERIELS ET METHODES

Souches : Les différentes souches de pneumocoque utilisées comme souches réceptrices, sensibles aux antibiotiques, sont mentionnées dans le tableau 13. Toutes sont des souches non encapsulées et par conséquent non pathogènes pour l'homme. Les souches dérivées de D 39 S, (type II), sont désignées par les noms habituellement utilisés dans les publications. Les autres souches, désignées par leur numéro dans la collection de BERNHEIMER seront parfois suivies par un numéro romain

TABLEAU 13

SOUCHES NONCAPSULEES ET TRANSFORMABLES DE PNEUMOCOQUE UTILISEES DANS CE CHAPITRE

Numéro de la souche ϕ	Autre désignation	Type capsulaire de la souche parentale	Références
654	D39R	II	AUSTRIAN et BERNHEIMER (non publié)
4	R36NC	II	MACLEOD et KRAUSS (1947)
5	R36A	II	AVERY, MACLEOD et MCCARTY (1944)
	R6	II	OTTOLENGHI et HOTCHKISS (1962)
	R6X	II	TIRABY et FOX (1973 b)
	C13	II	SICARD (1964)
	401	II	TIRABY et SICARD (1973 a)
	S III-1	II	TAYLOR (1949)
	RX	II	RAVIN (1959)
655	Lederle R	II	AUSTRIAN et BERNHEIMER (non publié)
656	RAT R	II	AUSTRIAN et BERNHEIMER (non publié)
477		I	BERNHEIMER et WERMUNDSEN (1972)
662	A66R	III	BERNHEIMER, WERMUNDSEN ET AUSTRIAN (1967)
1018	VI R	VI	BERNHEIMER, WERMUNDSEN et AUSTRIAN (1967)
1013	VII R	VII	BERNHEIMER, WERMUNDSEN et AUSTRIAN (1967)
264	VIII R	VIII	MACLEOD et KRAUSS (1956)

ϕ Numéro de la souche dans la collection de H. BERNHEIMER.

indiquant le type capsulaire de la souche capsulée de laquelle elles dérivent. Les souches 655 et 656, toutes deux dérivées de souches de type II, n'ont aucune parenté entre elles ou avec les souches issues de D 39 S ; la souche capsulée parente de 655 a été isolée chez l'homme alors que le parent de 656 a été isolé chez le rat.

Le DNA de pneumocoque est préparé à partir des souches indiquées dans le texte et à partir de la souche 119 (Chapitre IV, 116).

Le DNA de streptocoque est préparé à partir de la souche *Wicky*, un streptocoque de groupe H (Chapitre XI, 115).

Milieux : Les cellules croissent et sont maintenues dans le milieu B (43). Le milieu de transformation (milieu CH) décrit par GURNEY et FOX (46) est modifié par remplacement de l'extrait de levure fraîche par un extrait de levure préparé selon la méthode de SICARD (103). Lorsque la compétence est obtenue par la méthode de BERNHEIMER et WERMUNDSEN (5), l'uridine, l'adénosine et le pyruvate sont omis du milieu CH. Les souches C13 et 401 nécessitent la glutamine (200 µg/ml) pour une meilleure croissance dans tous les milieux. Les transformées sont sélectionnées dans le milieu M (Chapitre XI, 115) contenant l'agent sélectif et 1 % de sang citraté de cheval ou humain.

Préparation du DNA : Le DNA purifié de pneumocoque est préparé selon la méthode de ROSENTHAL et FOX (97). Les expériences dans lesquelles le DNA de la souche 119 est utilisé, sont effectuées avec la même préparation de DNA. Des lysats de cellules, traités à la pronase et possédant une bonne activité transformante, sont préparés de la manière suivante : Les cellules en phase stationnaire (10 ml) sont centrifugées et remises en suspension dans 1,5 ml de désoxycholate de sodium à 0,1 % dissout dans 0,15 M chlorure de sodium - 0,015 M citrate de sodium (SSC). Les cellules lysées sont incubées avec 250 µg de pronase à 45° jusqu'à ce que la solution visqueuse devienne claire (environ 30 minutes).

Le DNA de *B subtilis* préparé par la méthode de HASELTIME et FOX (47) est un don de SANDRO FORNILI.

Transformation : Les cultures sont initiées en inoculant le milieu B avec les bactéries provenant de cultures congelées ou lyophilisées. Puis les cellules sont alors mises à pousser dans le milieu CH pendant plusieurs générations. Afin d'obtenir les meilleurs rendements de compétence, les cellules doivent être transférées au moins trois fois dans les deux milieux. Des différences ont été observées entre les souches, dans les taux de croissance, dans la densité finale des cellules, ou dans le temps nécessaire pour réinitier la croissance après congélation et dégel, mais puisque ces différences n'interfèrent pas avec les résultats présentés dans ce chapitre, les caractéristiques individuelles de chaque souche ne sont pas présentées. Les cellules sont finalement rendues compétentes par la méthode de TIRABY et FOX (116) ou par la méthode de BERNHEIMER et WERMUNDSEN (5). Les

cellules compétentes congelées (-70°) ou préparées le jour même sont utilisées indifféremment.

A moins d'indication contraire dans le texte, les transformées pour toutes les souches sont sélectionnées aux concentrations d'antibiotiques suivantes : sulfonamide, 80 $\mu\text{g/ml}$; streptomycine, 200 $\mu\text{g/ml}$; acide fusidique, 50 $\mu\text{g/ml}$; novobiocine, 4 $\mu\text{g/ml}$; streptolydigue, 5 $\mu\text{g/ml}$; rifampine, 2 $\mu\text{g/ml}$; optochine, 2 $\mu\text{g/ml}$.

Fragmentation du DNA : Un volume de 5 ml d'une solution de DNA à la concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ dans NaCl 1 M, citrate de sodium 0,015 M, est soumis à l'action de lames aiguisées d'un homogénéisateur tournant à grande vitesse dans un petit récipient maintenu à 0° (VIRTIS Co, GARDINER, N. Y.). Le temps de la rotation est de 2 heures à la vitesse maximale de l'appareil (42 000 t/min.)

Provenance des antibiotiques : La provenance de la plupart des antibiotiques est indiquée dans le chapitre précédent. L'optochine et le sulfamilamide sont des produits CALBIOCHEM. La solution de sulfamilamide (5 mg/ml dans l'eau stérile) est gardée à la température ambiante. Les solutions dans l'eau stérile de la streptomycine (200 mg/ml), l'optochine (2 mg/ml) et l'acide fusidique (10 mg/ml) sont gardées à 4° . La rifampine et la streptolydigue sont d'abord dissoutes dans le diméthyle sulfoxyde pur (50mg/ml) ; les solutions sont alors diluées 10 fois dans l'eau stérile. La streptolydigue est conservée à -20° et la rifampine à 4° .

RESULTATS

EFFICACITES D'INTEGRATION DE DIVERS MARQUEURS DANS LES SOUCHES DERIVEES DE D 39 S.

La plupart des souches de pneumocoque utilisées dans les études de transformation dérivent du même parent. La généalogie des souches les plus largement étudiées est montrée dans la Figure 18. Nous avons transformé, dans les mêmes conditions expérimentales, toutes ces souches par le DNA de la souche 119 portant plusieurs marqueurs d'efficacité relatives différentes. Les résultats sont indiqués dans le tableau 14. Le clone non capsulé D 39 R isolé indépendamment vers 1959 à partir de la souche capsulée D 39 S et préservé à l'état lyophilisé, discrimine entre les marqueurs tout autant que le font les souches R 36 A, R 36 NC et R6.

Les souches R 6 X, RX et S III- $_1$ sont non discriminantes (hex^-). La souche S III-N d'où dérivent les souches RX et S III- $_1$ doit probablement être aussi hex^- mais puisque nous n'avons pu nous procurer cette souche, cette prévision n'a pu être vérifiée. Puisque la perte du pouvoir de discrimination est vraisemblablement sous la dépendance d'un seul gène (Chapitre II et IV) il semblerait qu'une mutation

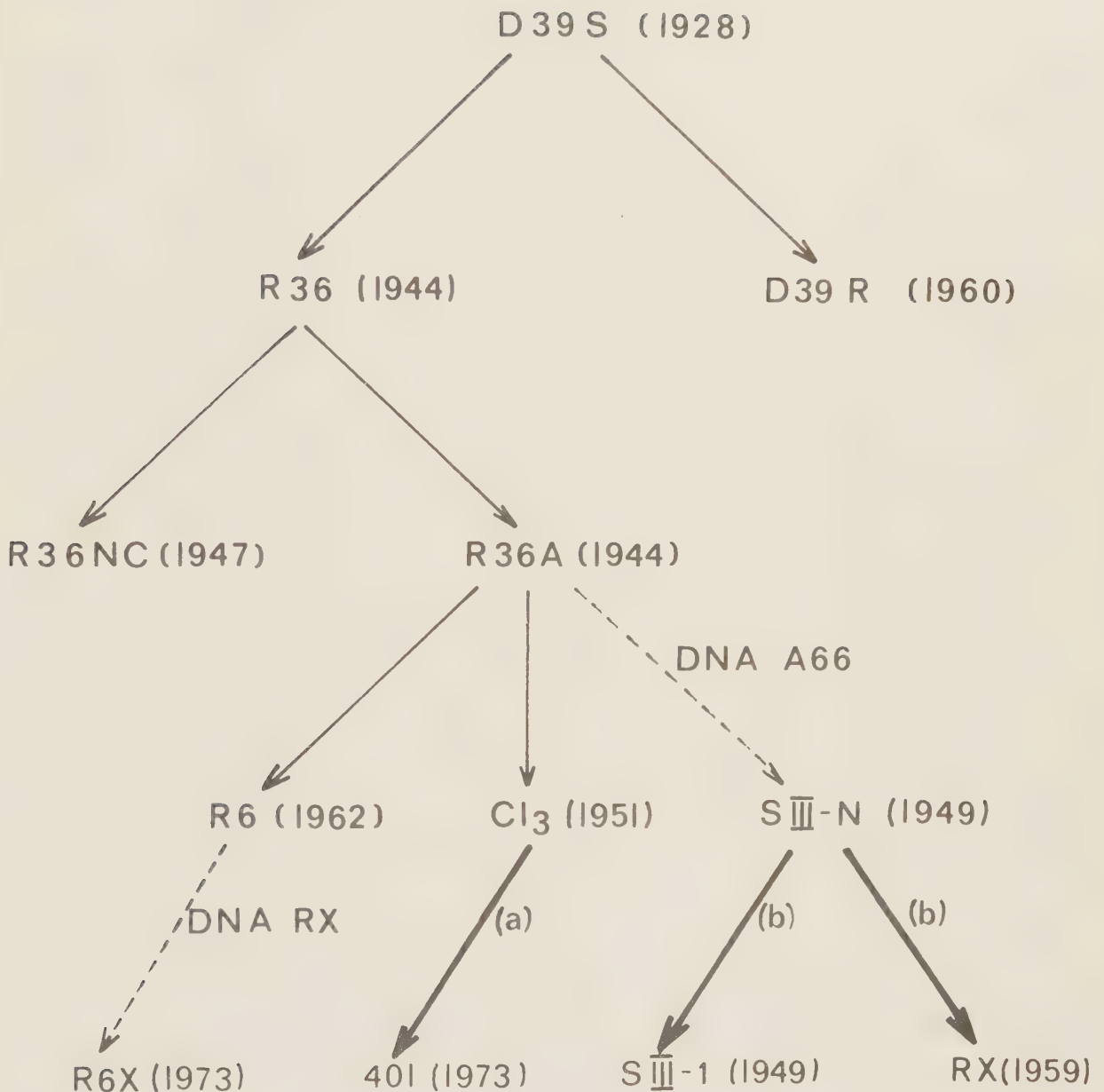


Figure 18 - GENEALOGIE DES SOUCHES DE PNEUMOCOQUE LES PLUS FREQUEMMENT UTILISEES.

Les dates associées au nom des souches correspondent à l'année de parution de la publication mentionnant pour la première fois le nom de la souche en question. Les souches non indiquées dans le tableau 13 ont été isolées par LAWSON (1928) D39S; AVERY, MacLEOD et MacCARTY (1944) R36 TAYLOR (1944) SIII_N.

Clonage, trait fin; transformation, pointillé; mutation, trait épais.

TABLEAU 14

Efficacités d'intégration de plusieurs marqueurs mesurées dans diverses souches de pneumocoques issues du même parent

Marqueurs	Antibiotique	D39R		R36NC		R36A		R6		R6X		SIII ₁		RX	
		(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
<i>str-r 41</i>	Streptomycine	430	1	3000	1	260	1	2750	1	685	1	335	1	475	1
<i>fus-r A</i>	Acide fusidique	360	0,84	3400	1,1	280	1,1	3350	1,2	760	1,1	355	1,1	450	0,9
<i>nov-r 1</i>	Novobiocine	40	0,09	295	0,10	20	0,08	280	0,1	-	-	360	1,1	470	1,0
<i>stg-r F</i>	Streptolydigne	45	0,10	215	0,07	16	0,06	265	0,1	820	1,2	370	1,1	430	0,9

(1) Nombre de transformées $\times 10^3$ /ml

(2) Efficacité d'intégration (rapport du nombre de transformées pour un marqueur donné au nombre de transformées pour le marqueur *str-r 41*).

Les cellules mises à pousser dans le milieu de compétence jusqu'à une densité d'environ 10^8 centres formateurs de colonies sont diluées au dixième dans le milieu de compétence préchauffé contenant 1 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de la souche 119. L'incubation de 20 minutes à 30° est suivi par une incubation de 2 heures à 37°. Après l'addition de glycérol (10 % concentration finale) une portion de la culture est congelée à -70° et la fraction restante est utilisée pour estimer le nombre de transformées. Le jour suivant un comptage plus précis du nombre de transformées pour chaque souche est effectué par étalement, après dilutions appropriées, des cellules de la culture dégelée dans du milieu gélosé contenant l'agent sélectif.

hex⁻ se soit produite soit au moment de la transformation de R 36 A par le DNA de la souche A 66 soit au début de la propagation de la souche transformée.

Toutes les souches réceptrices mentionnées dans le tableau 14 possèdent le même phénotype que la concentration du DNA donateur 119, soit saturante ou limitante (résultats non montrés). Nous avons cependant trouvé que les efficacités d'intégration des mêmes marqueurs dans les souches réceptrices Cl₃ et 401 dépendaient de la concentration du DNA 119 (tableau 15).

Dans la souche Cl₃, le nombre relatif de transformées pour un marqueur LE varie de 1 à 3 lorsque le DNA est non saturant ou en excès ; cette variation est nettement moindre avec 401 qui est une souche non discriminante. Si la souche Cl₃ est transformée avec du DNA extrait de la souche Cl₃ portant des marqueurs génétiques, les efficacités de transformation sont indépendantes de la concentration du DNA (26, et TIRABY, observation non publiée).

L'effet de la concentration du DNA observé dans la transformation de Cl₃ par du DNA de la souche 119 (souche dérivant de R6) ou dans la transformation de R6 par du DNA de la souche 69 (souche dérivant de Cl₃), (observation non publiée), pourrait être dû à une variation de la séquence des nucléotides dans les souches Cl₃ et R6. Bien que R6 et Cl₃ soient deux souches issues du même parent, R 36 A, les deux souches ont été utilisées dans différents laboratoires et ont été cultivées dans différents milieux depuis plus de deux décennies. Actuellement, la souche Cl₃ diffère de R6 ou des autres souches dérivées de D 39 S par beaucoup d'aspects : la souche Cl₃ qui est généralement plus résistante aux antibiotiques que R 6 est exigeante en glutamine et en uracile mais est prototrophe pour l'acide shikimique, alors que la souche R6 est prototrophe pour la glutamine et l'uracile et est auxotrophe pour l'acide shikimique (103 ; TIRABY et GASC, observation non publiée). De plus, l'hypothèse de la variation dans la séquence de nucléotides entre Cl₃ et R6 est renforcée par les observations que le marqueur *fus-r A*, à forte efficacité dans R6 est à faible efficacité dans Cl₃, et que les marqueurs de résistance à l'améthoptérine utilisés par SIROTNAK et HACHTEL (108) ont différentes efficacités dans les deux souches (128).

DISCRIMINATION PAR DES SOUCHES DE PNEUMOCOQUE D'ORIGINES DIVERSES ENTRE DES MARQUEURS PORTES PAR UN DNA EXTRAIT D'UNE SOUCHE HETEROLOGUE.

Diverses souches non capsulées, dérivées de souches présentant des sérotypes différents sont transformées avec du DNA de la souche 119. Avec un excès de DNA donateur, toutes les souches examinées montrent le phénotype hex⁻ : tous les marqueurs sont intégrés avec à peu près la même efficacité (tableau 16). L'effet de la concentration du DNA sur le pouvoir de discrimination de plusieurs souches est examiné.

La Figure 19 montre l'augmentation des transformées pour plusieurs marqueurs

TABLEAU 15

EFFICACITES D'INTEGRATION DES MARQUEURS MESUREES DANS LES SOUCHES Cl_3 ET 401

AVEC UNE CONCENTRATION LIMITANTE ET SATURANTE DE DNA DE LA SOUCHE 119

Marqueurs	Antibiotique	Souches réceptrices							
		Cl ₃			401				
		(1)	(3)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	
<i>str-r 41</i>	Streptomycine	80	1	545	1	32,5	1	190	1
<i>sulf-d</i>	Sulfanilamide	135	1,70	655	1,2	26	0,80	135	0,71
<i>fus-r A</i>	Acide fusidique	12	0,15	190	0,35	22	0,68	170	0,89
<i>nov-r 1</i>	Novobiocine	11,2	0,14	175	0,32	14,5	0,45	110	0,58
<i>stg-r F</i>	Streptolidigine	10,5	0,13	220	0,40	17	0,52	115	0,60

EFFICACITES D'INTEGRATION DE PLUSIEURS MARQUEURS MESURES DANS DES SOUCHES DE PNEUMOCOQUES NONCAPSULES DERIVANT DE SOUCHES DE SEROTYPES DIVERS

(1) Nombre de transformées $\times 10^3/\text{ml}$
 (2) Efficacités d'intégration relatives à *str^r* 47
 Même légende que dans le tableau 12

en fonction de l'augmentation de la concentration du DNA dans la souche réceptrice 1013. Cette souche est choisie parce qu'elle montre une légère discrimination avec un excès de DNA (tableau 15). On peut voir dans la figure 19 que le rapport des transformées est presque totalement indépendant de la concentration du DNA. La souche 662 se comporte de la même façon alors qu'on observe un léger, mais semble-t-il, significatif effet de la concentration du DNA dans la souche 264 (tableau 17).

Les marqueurs LE sont inactivés plus rapidement que les marqueurs HE lorsqu'une souche hex^+ est transformée avec du DNA artificiellement fragmenté (119, Chapitre VIII). Le DNA fragmenté est utilisé pour transformer les souches 264 et 662. Les efficacités d'intégration des marqueurs sont légèrement changées dans la souche 264 alors que les marqueurs utilisés possèdent la même efficacité dans 662, que le DNA soit natif ou fragmenté (tableau 17).

Tous les marqueurs testés, sont intégrés avec approximativement la même efficacité dans les souches réceptrices indiquées dans le tableau 17. La question se pose alors : les marqueurs sont-ils intégrés dans ces souches selon le mode caractéristique des marqueurs LE ou celui des marqueurs HE ? L'irradiation par la lumière ultraviolette du DNA in vitro entraîne la perte de l'activité biologique du DNA. Les marqueurs LE sont beaucoup plus sensibles à l'inactivation que ne le sont les marqueurs HE. L'importance de l'inactivation des marqueurs *str-r 41* et *nov-r 1* portés par le DNA 119 traité par le UV est déterminée dans plusieurs souches de phénotype apparent hex^- et dans les deux souches références R6 (hex^+) et R6X (hex^-) (figure 20). Les deux marqueurs sont inactivés avec approximativement le même taux dans les souches 264, 477 et 662, taux correspondant aux marqueurs HE dans la souche hex^+ . Selon ce critère, toutes les souches examinées présentent le phénotype hex^- . Ce résultat est inattendu car nous espérions plutôt rencontrer le phénotype hex^+ parmi ces souches sauvages de pneumocoques puisque nous avons montré dans les chapitres précédents que le phénotype hex^- provenait de la perte de la fonction hex par mutation.

DISCRIMINATION PAR DES SOUCHES DE PNEUMOCOQUE D'ORIGINES DIVERSES ENTRE DES MARQUEURS PORTES PAR UN DNA HOMOLOGUE.

Pour éviter de possibles interférences avec l'action de la fonction hex par un manque d'isogénicité entre le DNA de diverses souches et le DNA 119, quelques unes de ces souches sont transformées avec leur propre DNA porteur d'un marqueur de référence et d'une des mutations *rif-r* isolées de façon indépendante dans chacune des souches étudiées.

Le marqueur *str-r 41* de la souche 119 est introduit par transformation dans les souches 477 (RI), 1013 (R VII) et 264 (R VIII) en utilisant une très faible

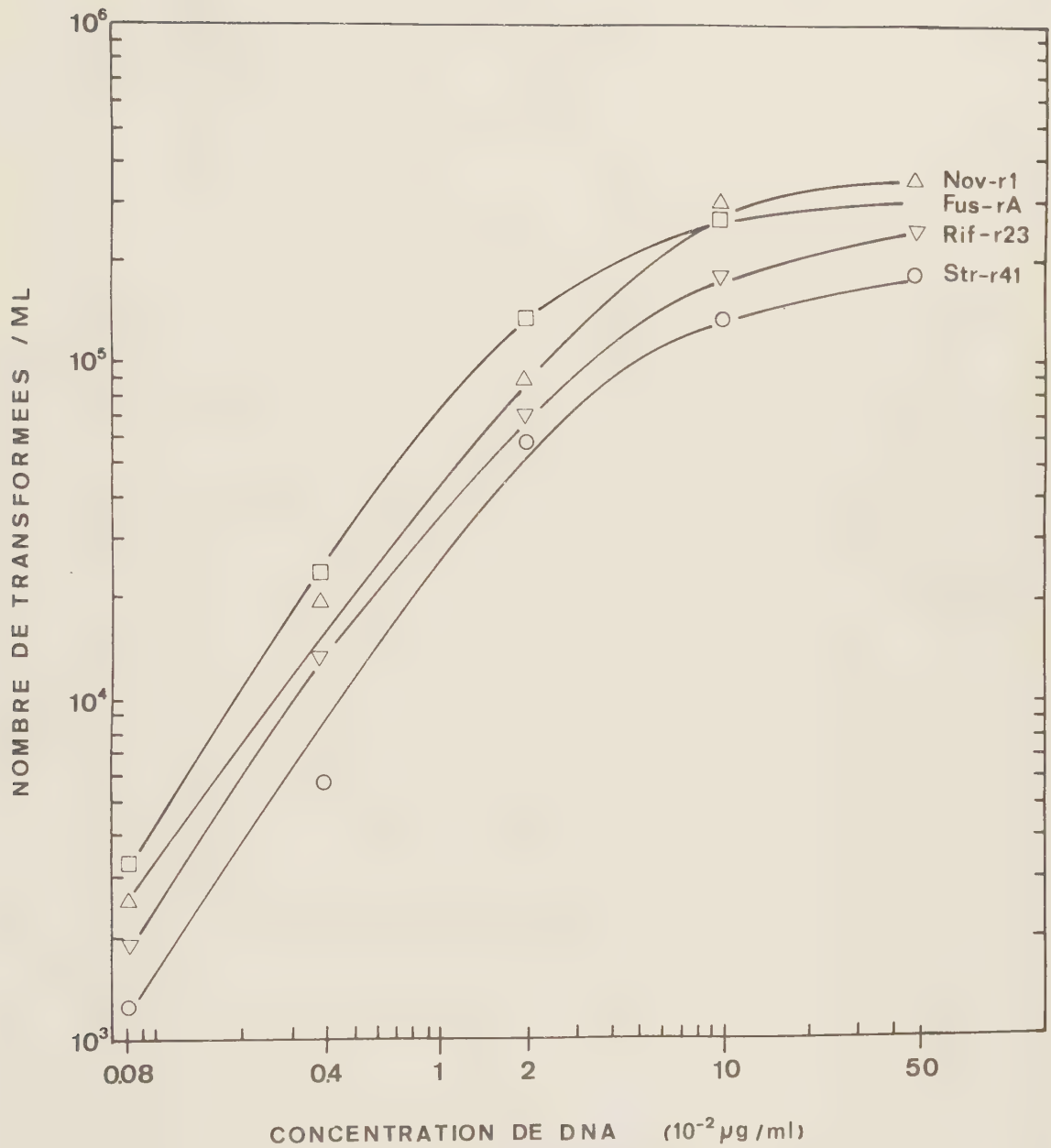


Figure 19 - AUGMENTATION DU NOMBRE DE TRANSFORMEES EN FONCTION DE CONCENTRATIONS CROISSANTES DE DNA DANS LA SOUCHE RECEPTRICE 1013.

L'échelle des concentrations est établie sur la base de l'obtention du plateau du nombre de transformées pour $0,1 \mu\text{g/ml}$ (50).

TABEAU 17

EFFET DE LA CONCENTRATION ET DE LA TAILLE DU DNA DONATEUR SUR LES EFFICACITES D'INTEGRATION
DES MARQUEURS MESUREES DANS LES SOUCHES RECEPTRICES R6, 662 ET 264

DNA donateur	Marqueurs	Souches réceptrices					
		R6		662 (RIII)		264 (RVIII)	
		(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Natif 119 (5 µg/ml)	<i>str-r</i> 41	2050	1	115	1	310	1
	<i>sulf-d</i>	3300	1,6	-		375	1,2
	<i>nov-r</i> 1	265	0,13	105	0,9	430	1,4
	<i>rif-r</i> 23	250	0,12	130	1,1	385	1,2
Natif 119 (0,02 µg/ml)	<i>str-r</i> 41	145	1	10,5	1	18,5	1
	<i>sulf-d</i>	265	1,8	-		24	1,3
	<i>nov-r</i> 1	20,5	0,14	11,5	1,1	40	2,2
	<i>rif-r</i> 23	16	0,11	12	1,1	35	1,9
Fragmenté 119 (0,5 µg/ml)	<i>str-r</i> 41	28,5	1	5,8	1	15	1
	<i>sulf-d</i>	115	4	-		22,5	1,5
	<i>nov-r</i> 1	2,8	0,10	5,6	1	36,5	2,4
	<i>rif-r</i> 23	2,6	0,09	5,5	0,9	25,5	1,7

(1) Nombre de transformées x 10³/ml

(2) Efficacités d'intégration

Les expériences présentées dans ce tableau ont été effectuées le même jour avec des cellules compétentes préparées le jour même. Des expériences identiques répétées une fois avec les souches 662 et 264, et plusieurs fois avec la souche R6 (116), ont donné essentiellement les mêmes résultats. La pénétration du DNA est terminée avec de la désoxiribonucléase (10 µg/ml) activée avec du Mg⁺⁺. Les cellules de la souche 662 apparaissent être résistantes à la sulfamilamide entraînant une mauvaise sélection des transformées *sulf-d*.

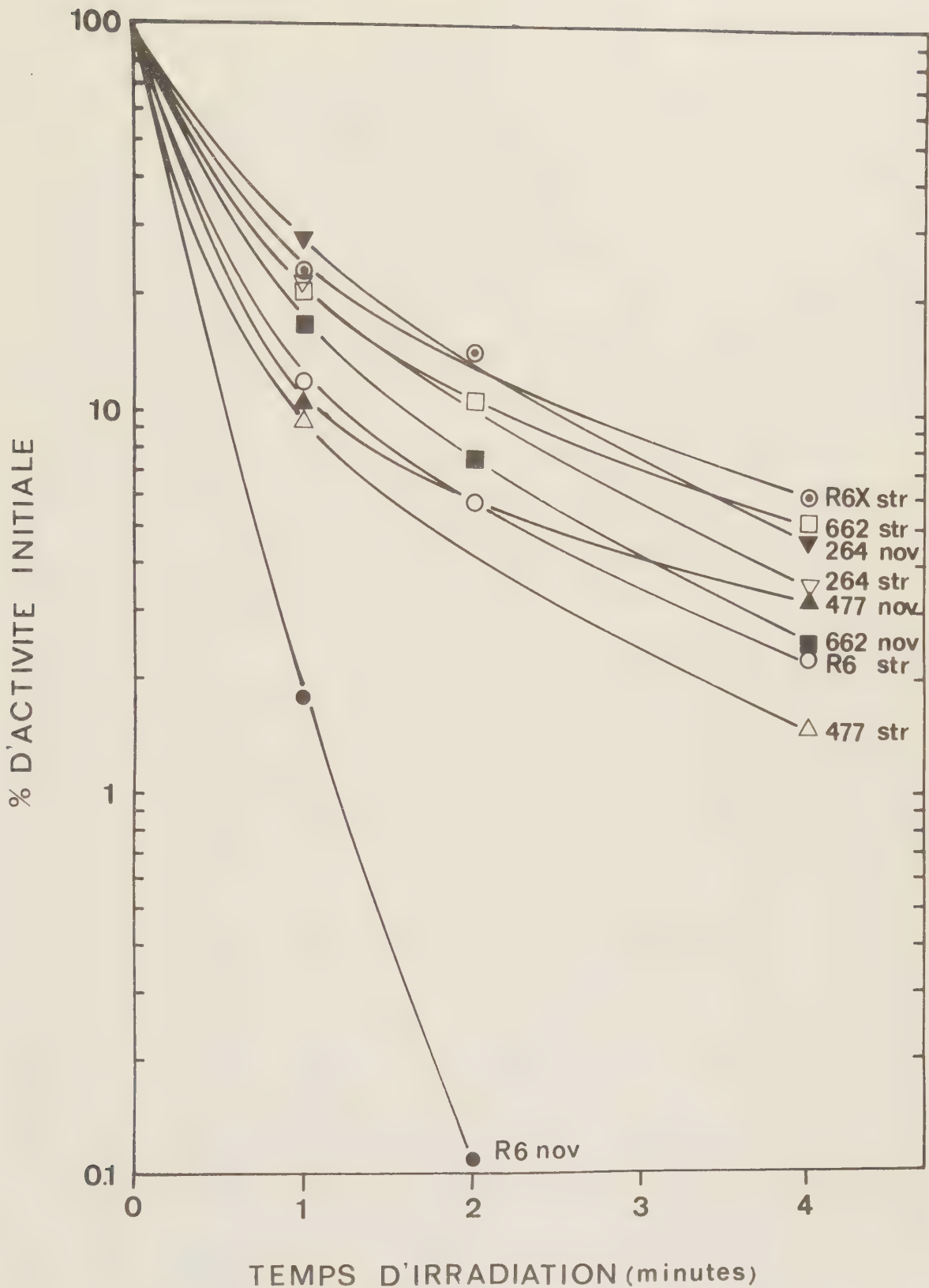


Figure 20 - INACTIVATION DES MARQUEURS *str-r41* ET *nov-r1* DETERMINEE DANS PLUSIEURS SOUCHES RECEPTRICES APRES IRRADIATION DU DNA IN VITRO PAR LES U.V.

L'irradiation du DNA est effectuée avec une lampe germicide General Electric à une distance de 33 cm.

quantité de DNA (10^{-3} µg/ml). Une mutation *str-r* d'origine spontanée est isolée dans la souche 655 (R II). Dans chacune de ces souches *str-r*, des mutations spontanées indépendantes, conférant la résistance à la rifampine sont isolées. Nous avons choisi des mutants spontanés plutôt que des mutations induites par des mutagènes parce que ces premières mutations présentent une plus grande diversité pour les efficacités d'intégration (116, Chapitre IV). Les mutants résistants à la rifampine sont faciles à sélectionner à une concentration d'antibiotique au moins 100 fois supérieure à la dose qui tue 50 % des bactéries sensibles. Dans chacune des souches, les mutations *rif-r* sont désignées par un chiffre arabe allant de 1 jusqu'au nombre du dernier mutant isolé.

Les nombres de transformées correspondant au DNA du clone portant la première mutation isolée dans chaque souche et au DNA d'un clone portant une mutation avec une efficacité différente sont indiqués dans le tableau 18.

Les 4 souches sont capables de discrimination entre les marqueurs lorsqu'elles sont transformées avec du DNA isogénique. Il est aussi intéressant de remarquer que le marqueur HE *str-r* 41 devient à faible efficacité dans la souche 264 mais reste HE dans les souches 477 et 1013.

La distribution des efficacités d'intégration des mutations isolées dans chacune des 4 souches étudiées est montrée dans la figure 21. Bien que le nombre de mutants analysés pour chaque souche soit relativement faible, il est indéniable que toutes les souches sont capables de faire une discrimination entre les marqueurs portés par du DNA homologue. Selon ce critère, ces souches possèdent le phénotype hex⁺.

TRANSFORMATION DE DIVERSES SOUCHES DE PNEUMOCOQUE PAR DU DNA HOMOLOGUE ET HETEROLOGUE.

Quatre souches sont transformées par du DNA extrait des souches homologues et par du DNA de diverses souches de pneumocoque d'origines indépendantes. Le but de cette expérience est d'abord de déterminer le comportement de ces souches réceptrices vis à vis des marqueurs portés par du DNA hétérologue de plusieurs souches différentes et ensuite de comparer les efficacités de transformation par du DNA homologue et hétérologue. Les résultats (tableau 19) montrent que les souches 477 (RI) et 264 (R VIII) se comportent de la même façon que la souche la plus fréquemment utilisée R6. Les deux souches discriminent entre les marqueurs portés par du DNA homologue. Le manque de discrimination avec le DNA hétérologue n'est pas dû à une efficacité réduite de ces DNA dans la souche réceptrice puisque pour une préparation donnée de DNA, le nombre relatif de transformées pour le marqueur le plus efficace est aussi élevé dans une souche hétérologue qu'homologue. Ces

TABLEAU 18

EFFICACITES D'INTEGRATION DE QUELQUES MUTATIONS RIF-R MESUREES DANS LES SOUCHES
RECEPTRICES HOMOLOGUES

	Souches réceptrices									
	477 (RI)		655 (RII)		1013 (RVII)				264 (RVIII)	
	rif1	rif10	rif1	rif4	rif1	rif5	rif11	rif20	rif1	rif2 rif5
Transformées str-r x 10 ³ /ml (1)	1200	1850	73,5	71	350	400	490	390	43	46 44
Transformées rif-r x 10 ³ /ml (2)	270	1900	79	425	120	75	500	560	250	47 24
Efficacité d'intégration (rapport (2)/(1))	0,22	1,0	1,1	6	0,34	0,19	1,0	1,4	5,8	1,0 0,5

Les cellules compétentes de chaque souche, préparées selon la méthode de BERNHEIMER et WERMUNDSEN (6) , sont diluées au cinquième dans le milieu de compétence préchauffé (30°). Un volume de 1 ml est ajouté à chaque tube d'une série contenant 50 µl du lysat traité à la pronase, de chacun des clones résistants à la rifampine. Chaque lysat est utilisé pour transformer seulement la souche parentale homologue.

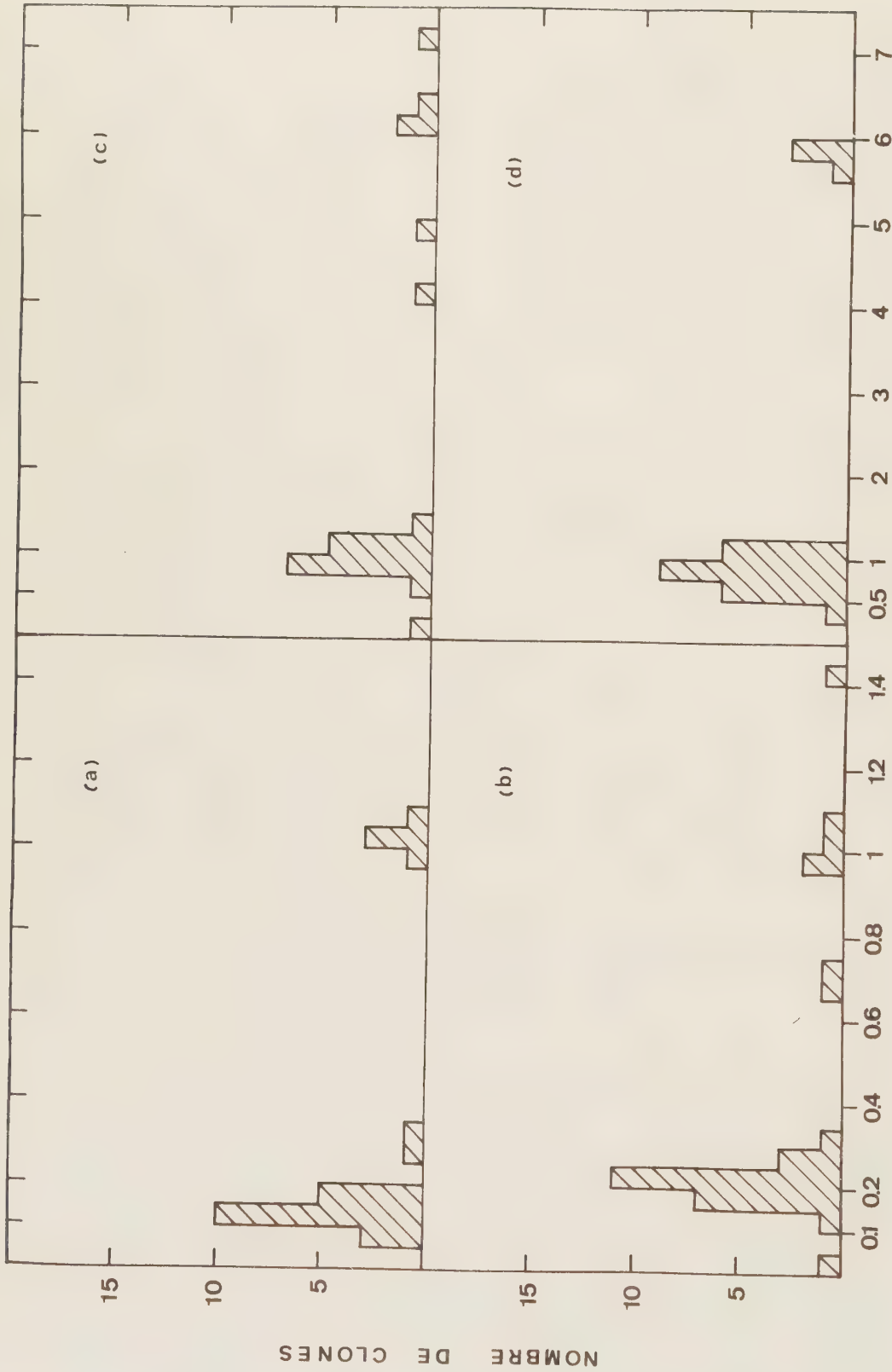


Figure 21 - DISTRIBUTION DES EFFICACITES D'INTEGRATION DES MUTATIONS rif^r APPARUES DANS DIVERSES SOUCHES.

Chaque barre représente le nombre de mutations dont les efficacités d'intégration sont comprises dans un intervalle de 0,05 (a et b) ou de 0,25 (c et d).

a souche 655; b souche 264; c souche 1013; d souche 477.

TABLEAU 19

COMPORTEMENT DES SOUCHES 477, R6, 662 ET 264 VIS À VIS DES MARQUEURS LE PORTÉS PAR
DU DNA HOMOLOGUE OU HÉTÉROLOGUE DE PNEUMOCOQUE

	Souches réceptrices											
	477 (RI)			R6			662 (RIII)			264 (RVIII)		
DNA donateur	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
477 rif 1	1550	325	0,21	790	800	1,0	230	260	1,1	160	145	0,90
R6 (119)	1500	1500	1	820	115	0,14	415	550	1,3	155	210	1,4
655 rif 1	455	900	2	350	350	1,0	115	95	0,8	70	65	0,9
264 rif 1	1250	1200	1	715	690	1,0	185	210	1,1	40	220	5,5

- (1) Nombre de transformées str-r x $10^3/\text{ml}$
- (2) Nombre de transformées rif-r x $10^3/\text{ml}$
- (3) Rapport (2) / (1).

résultats suggèrent que dans nos conditions expérimentales, les quatre souches examinées sont dépourvues d'un mécanisme du type restriction qui agirait sur du DNA provenant de pneumocoque de sérotype différent.

La validité de l'hypothèse que les souches 477 et 264 possèdent une fonction hex, fonctionnelle seulement avec du DNA homologue est indiquée par les résultats des expériences présentées dans les sections suivantes.

SATURATION DU MECANISME DE DISCRIMINATION DES SOUCHES R6 ET 264 PAR DU DNA HETEROLOGUE DE PNEUMOCOQUE.

Les cellules compétentes des souches 264 et R6 sont mises en contact avec un mélange de DNA homologue non saturant, biologiquement marqué et d'un excès de DNA hétérologue d'origines diverses, puis les nombres de transformées pour la résistance à la streptomycine et pour la résistance à la rifampine sont déterminés (tableau 20).

L'excès de DNA homologue n'a pas d'effet sur le nombre relatif des transformées *str-r* et *rif-r* tout comme le DNA hétérologue de *B. subtilis*. Le DNA de streptocoque n'a presque aucun effet. Par contre, le DNA hétérologue de pneumocoque montre une forte tendance à égaliser les activités des deux types de marqueurs. De l'observation directe du nombre de transformées, il peut être déduit que le nivellement des deux activités provient d'une augmentation de l'efficacité des marqueurs LE.

TRANSFORMATION DE R6 ET 264 PAR UN DNA PARTIELLEMENT HYBRIDE ENTRE LES DEUX SOUCHES.

Au cours d'autres études sur la transformation du pneumocoque, nous avons été amené à construire une souche multi-marquée. Nous avons introduit par deux transformations successives les marqueurs *str-r* 41 et *rif-r* 5 de la souche 264 (*rif-r* 5 mutant isolé dans 264 et *str-r* 41 mutant isolé dans R6 et transféré dans 264) dans le génome de la souche R6 portant déjà les marqueurs *sulf-d*, *fus-r* A, *ery-r* 2, *opt-r* 2 et *nov-r* 1. Le DNA de la souche ainsi construite, appelée souche 121, renfermant tous les marqueurs mentionnés au-dessus, à l'exception de *sulf-d* perdu au cours de la dernière transformation, a été utilisé pour transformer la souche R6. Les résultats de ces analyses sont résumés dans le tableau 21 et la figure 22.

Lorsque la souche R6 est transformée avec le DNA hybride, la discrimination entre des marqueurs HE et LE est nettement moins prononcée que lorsque R6 est transformée par un DNA strictement homologue. Ceci est particulièrement frappant

TABEAU 20

COMPORTEMENT DU MECANISME DE DISCRIMINATION AU COURS DE LA TRANSFORMATION DES SOUCHES R6 ET 264
A LA COMPETITION ENTRE LE DNA HOMOLOGUE ET DU DNA HETEROLOGUE ISSU DE DIVERSES SOURCES

Souches réceptrices	DNA donateur homologue (0,005 µg/ml)	DNA compétiteur hétérologue (1-5 µg/ml)	Nombre de transformées str-r x 10 ⁷ /ml	Nombre de transformées rif-r x 10 ⁷ /ml	rif-r/str-r
R6	R6 (119)	R6	2500	325	0,13
		264 (RVII)	4800	5250	1,1
		1013 (RVII)	2150	2600	1,2
		streptocoque (Wicky)	3350	670	0,20
		<i>B. subtilis</i>	1700	255	0,15
264 (RVIII)	264 <i>str-r</i> 41, <i>rif-r</i> 1	264 (RVIII)	190	1150	6,1
		R6	530	500	0,95
		1013	525	500	1,0
		streptocoque (Wicky)	200	1000	5,0
		<i>B. subtilis</i>	56	335	6,0

Un volume de DNA de la souche 119 ou de la souche 264 *str-r* 41, *rif-r* 1 (1 µg/ml) est mélangé avec un volume de 1 ml des divers DNA compétiteurs indiqués dans le tableau (20-100 µg/ml) et une fraction du mélange (100 µl) est ajouté à 1 ml de cellules compétentes de chacune des souches réceptrices pendant 20 minutes à 30°. Quatre ml de milieu B sont ajoutés et les cultures sont incubées à 37° pendant 2 heures.

TABLEAU 21

EFFET DE LA CONCENTRATION ET DE LA TAILLE DU DNA DONATEUR SUR LES EFFICACITES
D'INTEGRATION DES MARQUEURS PORTES PAR LE DNA DE LA SOUCHE 121 DANS
LES SOUCHES RECEPTRICES R6 ET 264

DNA donateur	Marqueurs	Souches réceptrices			
		R6		264 (RVIII)	
		(1)	(2)	(1)	(2)
Natif 121 (5 µg/ml)	<i>fus-rA</i>	2100	1	410	1
	<i>ery-r2</i>	2900	1,4	310	0,76
	<i>nov-r1</i>	1650	0,79	395	0,96
	<i>str-r41</i>	1300	0,62	380	0,92
	<i>rif-r5</i>	1050	0,50	330	0,80
Natif 121 (0,002 µg/ml)	<i>fus-rA</i>	30,5	1	7,5	1
	<i>ery-r2</i>	28	0,92	3,0	0,40
	<i>nov-r1</i>	6,5	0,21	3,55	0,47
	<i>str-r41</i>	3,8	0,12	2,8	0,37
	<i>rif-r5</i>	5,5	0,18	6,0	0,80
Fragmenté 121 (0,5 µg/ml)	<i>fus-rA</i>	210	1	35	1
	<i>ery-r2</i>	105	0,5	9,0	0,26
	<i>nov-r1</i>	10,5	0,05	10,5	0,30
	<i>str-r41</i>	4,6	0,02	7,5	0,21
	<i>rif-r5</i>	5,0	0,02	29	0,83

(1) Nombre de transformées x 10²/ml

(2) Efficacités d'intégration

Même légende que dans le tableau 15

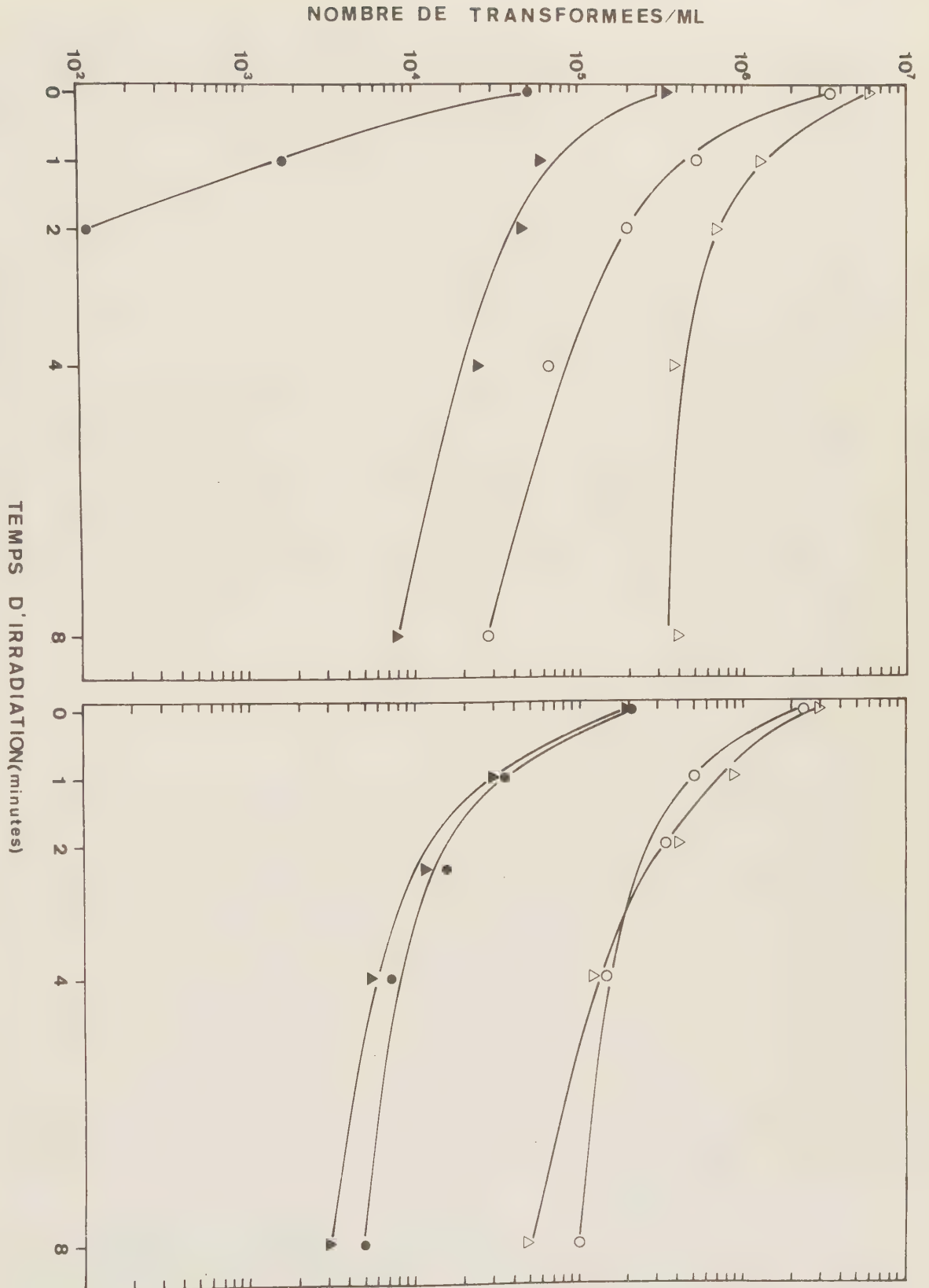


Figure 22 - INACTIVATION DES MARQUEURS *fus-r* ET *rif-r* EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DU DNA APRES IRRADIATION DU DNA AUX U.V.

Les souches réceptrices sont R6 (gauche) et R6X (droite). La concentration du DNA donateur extrait de la souche 121 est 5 µg/ml (symboles ouverts) et 0,01 µg/ml (symboles fermés). Marqueurs *fus-r*4 (triangles) *rif-r*5 (cercles).

avec le marqueur *nov-r* 1. La discrimination qui est faible avec un excès de DNA 121 est augmentée pour des concentrations limitantes de ce même DNA. La fragmentation du DNA permet au mécanisme de discrimination de fonctionner même à concentration saturante. La souche 264 se comporte qualitativement de la même manière, mais avec une capacité réduite à discriminer. La modification de l'activité de certains marqueurs par passage dans une souche hétérologue confirme l'hypothèse d'une variation de la séquence de nucléotides dans le DNA contrôlant la même fonction dans deux souches non apparentées. On peut observer dans le tableau 21 que *str-r* 41 normalement à forte efficacité dans R6 devient à faible efficacité dans cette même souche après passage dans la souche 264.

Dans la souche R6 (hex^+), la baisse de l'activité du marqueur LE qui résulte de l'irradiation du DNA 121 par la lumière ultraviolette dépend largement de la concentration du DNA donateur (figure 22). Avec un excès de DNA, le marqueur LE montre une sensibilité aux UV légèrement augmentée comparativement au marqueur HE alors que pour une faible concentration de DNA, la cinétique d'inactivation des deux marqueurs est celle attendue dans le cas d'une fonction entièrement active. Dans la souche réceptrice R6X, les activités des deux marqueurs baissent approximativement au même taux, que la concentration de DNA soit saturante ou pas.

DISCUSSION

La propriété de discrimination entre les marqueurs manifestée par les diverses souches hex^+ apparentées, actuellement utilisées dans différents laboratoires, est également présente dans un clone de bactéries non capsulées, isolé récemment dans le parent original, lui-même isolé chez un malade à la fin de la première guerre mondiale. Deux sousclones ont perdu le pouvoir de discrimination, probablement à la suite d'une mutation spontanée. La souche 84, décrite par LITMAN (61) est aussi apparue spontanément dans la souche R6 (LITMAN et LERMAN, communication personnelle). Les bactéries hex^- semblent présenter un avantage sélectif sur les organismes hex^+ car les mutants hex^- apparaissent avec une incidence élevée soit spontanément soit après un traitement mutagène (59- 71- 111). LACKS (59) a trouvé qu'un traitement répété de bactéries hex^+ avec la nitrosoguanidine augmente le nombre d'organismes hex^- jusqu'à une fréquence qui atteint la moitié de la population totale.

Les transformations réciproques des deux souches discriminantes les plus largement étudiées, révèlent que le produit de la transformation des marqueurs LE dans ces souches dépend dans une certaine limite de la concentration du DNA donateur. En dépit de leur origine commune, les deux souches utilisées comme souches standards dans beaucoup de laboratoires ont probablement évolué différemment par suite de conditions de croissance différentes pendant plus de deux décennies. La

variation de la séquence des nucléotides dans le DNA des deux souches est attestée par le changement de l'efficacité de *fus-r A* et de plusieurs mutants *ame-r* dans les deux souches (128). L'effet de la concentration du DNA non strictement isogène pourrait s'expliquer par une augmentation du nombre de molécules de DNA dans une même cellule, et de là, du nombre de paires de bases mal appariées. Ces bases mal appariées mobilisent le système de discrimination permettant ainsi à plus d'hétérozygotes du type LE d'échapper à la destruction. Cette hypothèse est renforcée par le comportement dans la transformation, avec du DNA homologue ou hétérologue, de différentes souches sauvages de pneumocoque, examinées dans cette étude. Toutes les souches examinées présentent le phénotype hex^+ lorsque les marqueurs sélectionnés sont portés par du DNA provenant de la même souche que la réceptrice. Cependant, dans les transformations réciproques, ces souches se comportent typiquement comme des bactéries hex^- . La comparaison des résultats des transformations réciproques entre les souches R6 et Cl_3 et avec ceux des transformations réciproques entre certaines souches sauvages indépendantes, suggère que ces dernières souches diffèrent plus les unes des autres que R6 de Cl_3 , en ce qui concerne les séquences des nucléotides dans leur DNA.

Une évidence supplémentaire pour cette hypothèse se trouve dans les résultats des expériences de compétition entre un DNA homologue marqué et un DNA hétérologue non marqué. Lorsque l'intégration physique d'un DNA hétérologue dans le génome récepteur n'est pas possible par manque d'homologue comme dans le cas du DNA de *B. subtilis* (107), ou est très réduite, comme dans le cas du DNA de streptocoque (115), la compétition provoquée par un excès de DNA hétérologue n'a aucun effet sur les efficacités d'intégration caractéristiques des marqueurs portés par le DNA homologue en concentration limitante. Par conséquent, le mécanisme de saturation ne peut fonctionner qu'avec un DNA susceptible de s'intégrer.

L'effet de la concentration du DNA sur l'activité relative des marqueurs, observé avec le DNA d'une souche hybride portant des marqueurs de deux souches non apparentées, est plus accentué que l'effet similaire observé au cours des transformations réciproques de R6 et Cl_3 . Avec le DNA hybride à concentration saturante, la fonction hex de la souche réceptrice est presque complètement saturée. Dans d'autres expériences nous avons vu que la fonction hex ne discrimine pas contre les marqueurs LE portés par des concentrations même limitantes de DNA de souches hétérologues. L'on peut déduire de ces observations que la fonction hex est saturée soit par une molécule du DNA donateur susceptible de créer beaucoup de paires de bases mal appariées au cours de l'appariement, soit par plusieurs molécules renfermant un nombre relativement faible de bases non-complémentaires aux bases correspondantes sur le brin du DNA récepteur. Si le mécanisme de correction suggéré par EPHRUSSI-TAYLOR (25) et confirmé par TIRABY et FOX (118,119, Chapitre 8) est réel-

lement responsable de la perte d'une fraction des transformées LE, un intermédiaire enzymatique du mécanisme doit être alors limitant. Il est utile d'insister sur le fait que toutes les souches examinées se comportent de façon identique en ce qui concerne la saturation de la fonction hex par le DNA hétérologue. Ainsi, il apparaît que l'étape limitante, vraisemblablement la quantité limitante d'une enzyme, est une caractéristique générale du pneumocoque. Une souche mutante d'un grand intérêt serait une souche capable de discrimination pour du DNA hétérologue autant que pour du DNA homologue, par suite d'une augmentation de la quantité ou de l'activité de l'enzyme normalement limitante. Cette enzyme pourrait être une endonucléase, spécifique de certaines paires de bases mal appariées formées dans l'hétéroduplex donneur-récepteur. Une enzyme possédant une telle activité n'a pas été rapportée dans la littérature.

Il est tentant de considérer que les pneumocoques ont développé un système de défense unique dans son genre contre tout DNA étranger susceptible d'être intégré dans leur génome ou contre des mutations spontanées ou induites, indésirables, pendant la croissance normale. Au contraire de *Haemophilus influenzae* où un système de restriction actif semble limiter les échanges de DNA entre deux souches de sérotypes différents (38), les pneumocoques semblent dépourvus d'un tel mécanisme car le DNA hétérologue de pneumocoque est aussi efficace que le DNA homologue dans la transformation.

L'effet de saturation est un critère opérationnel sensible pour déterminer le manque d'homologie entre deux souches de pneumocoques. Et dans cet ordre d'idées, il serait intéressant d'utiliser le mécanisme de discrimination du pneumocoque comme outil pour étudier l'évolution des séquences de DNA in vivo. En faisant pousser des cellules de pneumocoques génétiquement marquées et de génotype divers dans des chemostats, il devrait être possible de suivre l'évolution de la séquence des nucléotides en fonction du nombre de générations. Les fortes concentrations de DNA, extrait à différents moments de l'évolution des cellules devraient progressivement saturer la fonction hex des bactéries compétentes non marquées de la souche de départ.

CHAPITRE VI

ESSAI DE DETERMINATION DES CONFIGURATIONS MOLECULAIRES
RECONNUES PAR LE PROCESSUS DE DISCRIMINATION

L'utilisation de mutagènes spécifiques de certains types de mutations a permis d'établir des corrélations partielles entre la nature d'une mutation et son efficacité intrinsèque d'intégration. C'est ainsi que SICARD (103) a montré que l'acide nitreux, connu pour sa spécificité à induire des mutations de transitions, provoquaient des mutations appartenant préférentiellement à la classe des marqueurs LE. De même l'action de l'hydroxylamine, un autre mutagène spécifique de la transition de la paire de bases G : C vers T : A (22), sur le DNA transformant, entraîne l'apparition après transformation de mutations de la classe LE (36 - 58). Tous ces travaux que nous venons de citer ont été réalisés uniquement avec des souches discriminantes de pneumocoque. Il nous a paru intéressant de connaître le comportement des souches non discriminantes vis à vis du DNA transformant traité avec l'un ou l'autre de ces mutagènes. Nous avons comparé dans les deux souches réceptrices hex^- et hex^+ , d'une part, les cinétiques d'inactivation de l'activité des DNA traités soit par l'acide nitreux soit par l'hydroxylamine et d'autre part les cinétiques d'apparition des mutants. Enfin nous avons essayé de confirmer l'appartenance des mutations induits par l'un ou l'autre de ces agents chimiques à la classe LE.

MATERIELS ET METHODES

Traitement du DNA avec l'acide nitreux ou l'hydroxylamine : Le DNA de la souche R6 str-r 41, nov-r 2 est isolé selon la méthode de GURNEY et FOX (46). Le mélange réactionnel de HNO_2 contenant des volumes égaux de DNA (50 $\mu\text{g/ml}$) dans la solution 0,1 M Tris ; 0,01 M EDTA ; de Na NO_2 4M et de tampon acétate 1,5 M, est incubé à 37°. A différentes périodes, des aliquots de 1 ml sont mélangés avec 2 ml d'alcool froid (95°). Le mélange devenu légèrement trouble est centrifugé à 15000 rpm pendant 10 minutes, et le culôt est remis en suspension dans la solution 10^{-2} M Tris, 10^{-3} M EDTA, pH 8.0.

Le mélange réactionnel de HONH_2 contenant 1 volume de DNA (50 $\mu\text{g/ml}$) dans la solution 0,1 M Tris ; 0,01 M EDTA, et 2 volumes de 3,5 M NH_2OH , HCl, ajusté au pH 7,0 avec la soude, est incubé à 75°. A divers intervalles de temps, la réaction

est arrêtée par l'addition de 2 volumes de la solution froide suivante : 1 M NaCl ; 0,05 M Tris (pH 7,4) ; 10 % acétone. Un volume d'alcool double du volume final est ajouté, le mélange est centrifugé à 15000 rpm pendant 10 minutes, et le culôt est remis en suspension dans la solution 10^{-2} M Tris ; 10^{-3} M EDTA, pH 8.0.

Sélection des transformées et des mutants : Les cellules compétentes dégelées sont diluées au cinquième dans le milieu de transformation (CH) contenant le DNA (5 µg/ml), et incubées à 30° pendant 30 minutes. Deux volumes de milieu B contenant 10 µg/ml de désoxyribonucléase pancréatique (Worthington) sont ajoutés et la culture est incubée à 37°, pendant 2 heures. Les transformées sont sélectionnées dans le milieu M contenant l'antibiotique. Puisque le locus *fus* est lié à *str-r* 41 (environ 30 %), les mutants *fus-r* parmi les transformées *str-r* sont sélectionnés dans le milieu contenant à la fois la streptomycine et l'acide fusidique (50 µg/ml), après la mise en contact des cellules compétentes avec le DNA *str-r* 41, *fus-r* traité par les mutagènes. Le DNA traité soit 30 minutes avec l'hydroxylamine soit 2 minutes avec l'acide nitreux est utilisé pour l'isolement de mutants induits *fus-r*. Le DNA traité est ajouté à une culture compétente de bactéries R6 ou R6X. Après 20 minutes d'incubation à 30°, 2 volumes de milieu B sont ajoutés et la culture est divisée en plusieurs aliquots. Après une expression du phénotype des mutants induits pendant 2 heures à 37°, les mutants *fus-r* sont sélectionnés comme décrit au-dessus. Les cultures sont préparées à partir d'une seule colonie prélevée dans chacune des boîtes correspondant à différents aliquots.

RESULTATS

ACTION DE L'HYDROXYLAMINE SUR LE DNA TRANSFORMANT.

L'hydroxylamine réagit avec le DNA dans des conditions permettant la séparation localisée des deux brins complémentaires (34). Comme conséquence, l'activité transformante du DNA est réduite et des altérations mutationnelles sont induites. La cinétique d'inactivation et l'activité mutagène du DNA traité avec HONH_2 sont comparées dans les souches R6 et R6X.

Les activités transformantes d'un marqueur à forte efficacité (*str-r* 41) et d'un marqueur à faible efficacité diminue au même taux dans la souche discriminante (figure 23). Même après une inactivation importante (2 heures), l'efficacité d'intégration de *nov-r* 1 par rapport à *str-r* 41 est pratiquement la même que celle mesurée avec le DNA natif. L'activité transformante du marqueur *str-r* 41 baisse légèrement moins vite dans la souche non discriminante (figure 24).

Les modalités de la mutagenèse par l'hydroxylamine semblent identiques dans les souches hex^- et hex^+ . Le nombre le plus élevé de mutants *fus-r* est obtenu

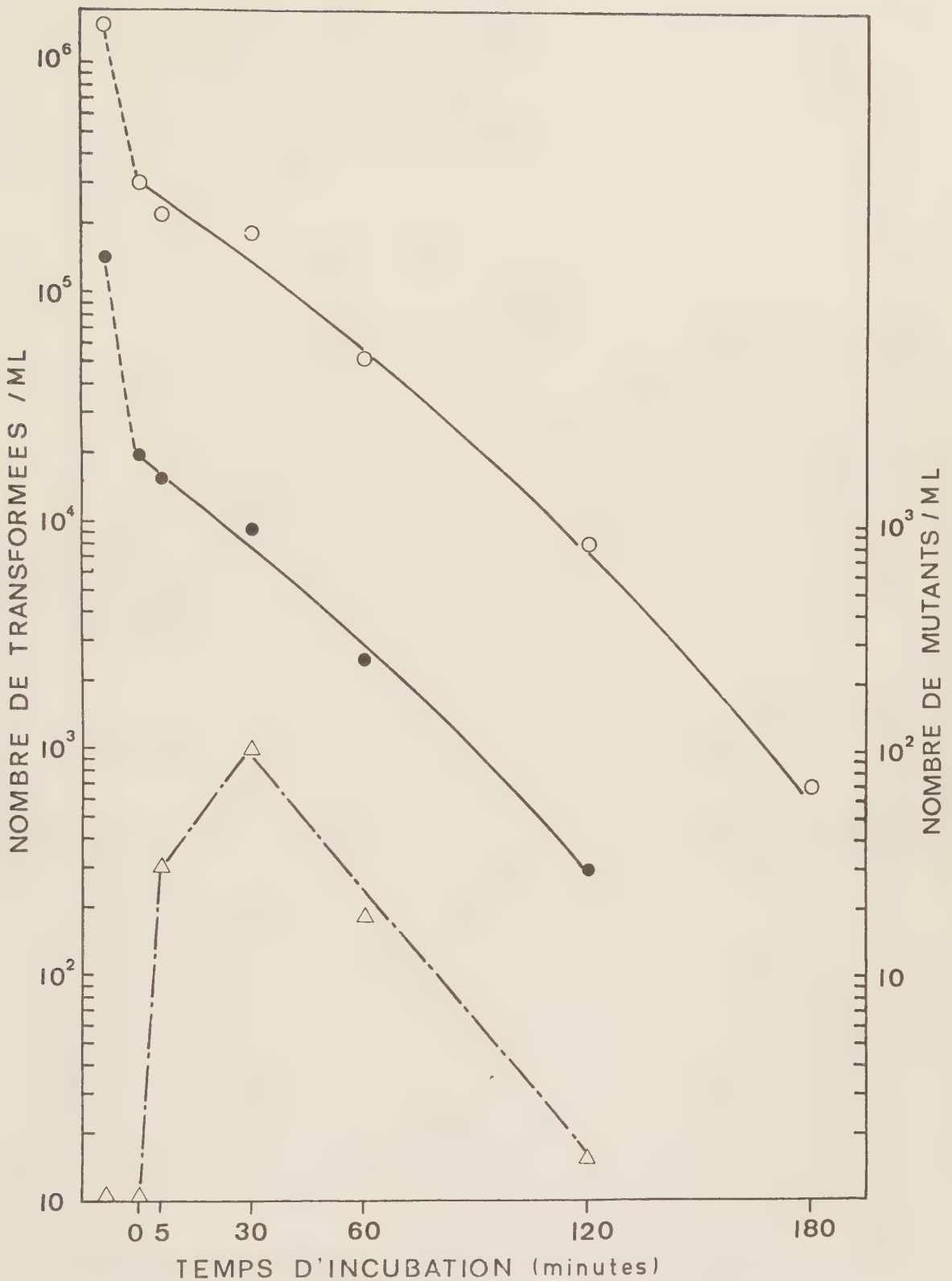


Figure 23 - ALTERATIONS GENETIQUES PROVOQUEES PAR L'HYDROXYLAMINE SUR LE DNA TRANSFORMANT.

Le premier point sur les trois courbes correspond au DNA non traité. Les valeurs à 0 minute sont celles obtenues avec l'échantillon pris immédiatement après avoir mélangé l'hydroxylamine avec le DNA.

Souche réceptrice: R6; transformées *str-r* (O); transformées *nov-r* (●); mutants *fus-r* (Δ).

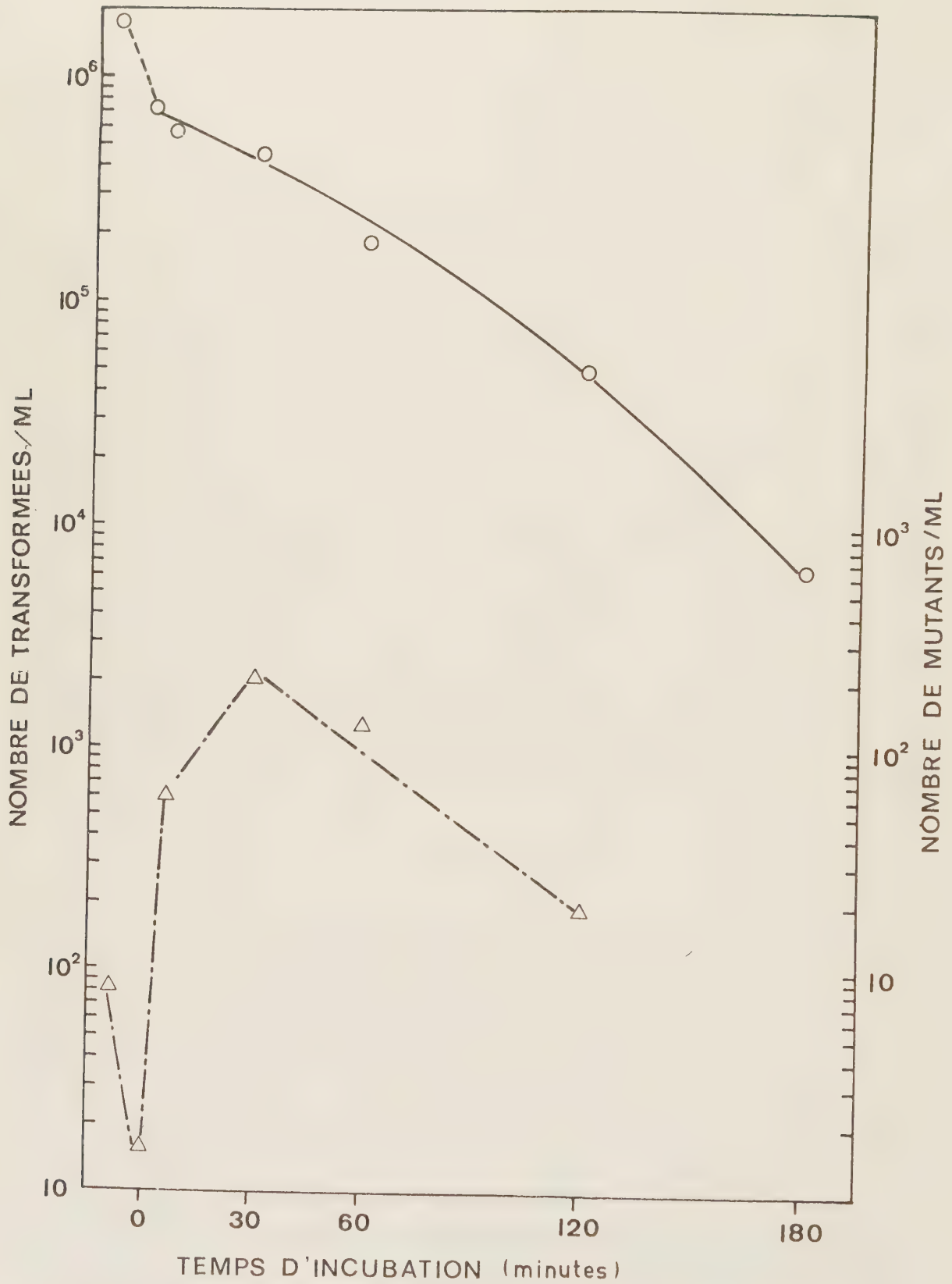


Figure 24 - ALTERATIONS GENETIQUES PROVOQUEES PAR L'HYDROXYLAMINE SUR LE DNA TRANSFORMANT.

Souche réceptrice: R6X nov-r; transformées *str-r* (O); mutants *fus-r* (Δ).

après une incubation de 30 minutes. Puis pour des temps supérieurs le nombre absolu de mutants diminue parallèlement au nombre de transformées. On obtient la même fréquence de mutants induits par le traitement à l'hydroxylamine dans les deux souches.

ACTION DE L'ACIDE NITREUX SUR LE DNA TRANSFORMANT.

En accord avec l'observation de LITMAN (64), le traitement du DNA transformant avec l'acide nitreux entraîne la perte de l'activité biologique et l'apparition d'altération mutationnelle dans le DNA. Le marqueur *nov-r 1* est inactivé à peine plus rapidement que le marqueur *str-r 41* dans la souche R6 (figure 25). L'activité du marqueur HE est perdue à la même vitesse dans la souche R6X (figure 26). La fréquence de mutations *fus-r* par unité d'activité transformante atteint un maximum après 2 minutes de traitement puis pour des temps supérieurs reste constant malgré l'inactivation progressive de l'activité transformante (figures 25 et 26). L'incidence de mutation après traitement avec l'acide nitreux est la même dans la souche discriminante et la souche non discriminante.

DISTRIBUTION DE L'EFFICACITE D'INTEGRATION DES MARQUEURS RESISTANTS A L'ACIDE FUSIDIQUE INDUITS PAR L'HYDROXYLAMINE OU L'ACIDE NITREUX.

Des mutants indépendants *fus-r*, résultant du traitement du DNA transformant par l'hydroxylamine ou l'acide nitreux sont isolés et leurs efficacités d'intégration individuelles par rapport au marqueur *str-r 41* sont mesurées dans la souche R6. Les résultats de ces expériences sont montrés dans les figures 27 et 28. D'après leurs efficacités d'intégration, les mutants induits par l'hydroxylamine et isolés dans, soit la souche hex^+ soit la souche hex^- , se rangent presque exclusivement dans la classe avec une faible efficacité d'intégration (figure 27). Des résultats identiques sont obtenus avec les mutants induits par l'acide nitreux (figure 28). Les efficacités observées dans ces expériences montrent des valeurs absolues plus élevées et un spectre plus large que la classe LE décrite par EPHRUSSI-TAYLOR, SICARD et KAMEN (26) ; LACKS (58) ; SIROTNAK et HACHTEL (108) ; GASC et SICARD (36) ; TIRABY et SICARD (chapitre III, 113). Des études génétiques ont montré que les marqueurs LE abaissent les efficacités des marqueurs HE très liés (58 - 65 - 106). Le marqueur à forte efficacité *str-r 41* génétiquement lié à certains marqueurs *fus-r* a été utilisé comme marqueur de référence pour déterminer les classes d'efficacité pour les marqueurs *fus-r*. La présence d'un marqueur *fus-r* de la classe LE pourrait réduire le nombre absolu de transformées *str-r* ce qui conduirait à une surestimation de la valeur de l'efficacité du marqueur. La validité de cette hypothèse a été testée en comparant le nombre de transformées pour

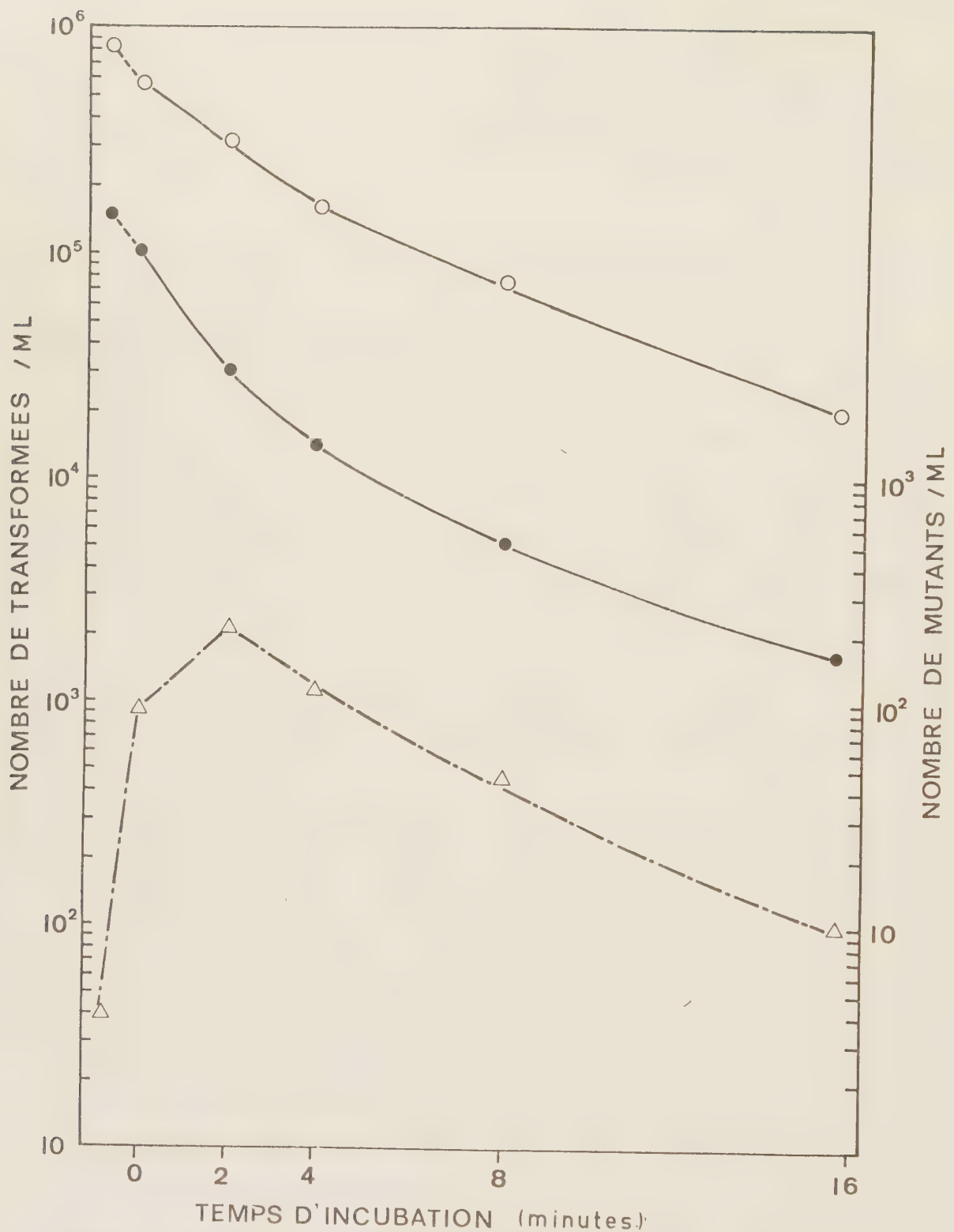


Figure 25 - ALTERATIONS GENETIQUES PROVOQUEES PAR L'ACIDE NITREUX SUR LE DNA TRANSFORMANT.

Le premier point sur les trois courbes correspond au DNA non traité. Les valeurs à 0 minute sont celles obtenues avec l'échantillon pris immédiatement après avoir mélangé l'acide nitreux avec le DNA.

Souche réceptrice : R6; transformées *str-r* (O); transformées *nov-r* (●); mutants *fus-r* (Δ).

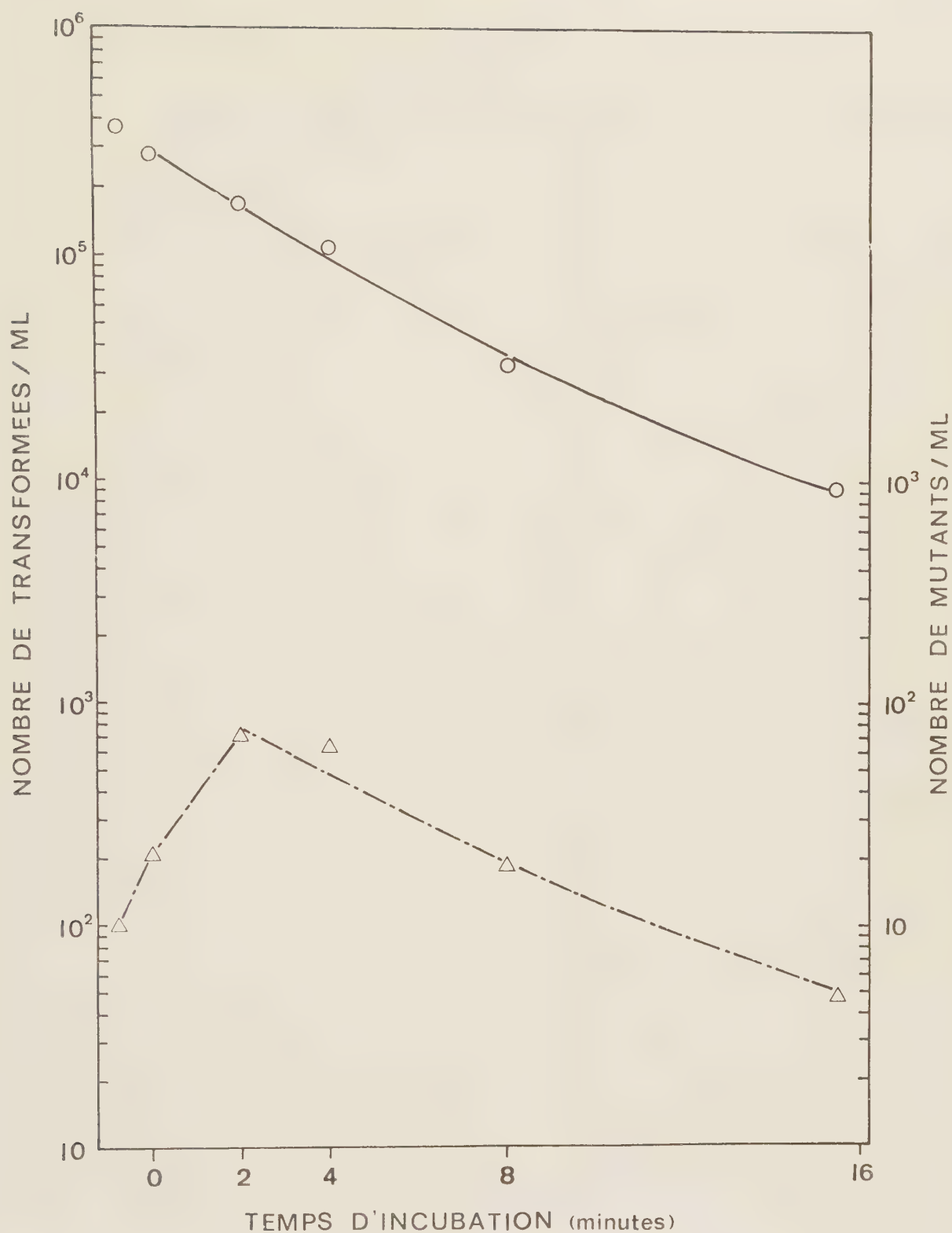


Figure 26 - ALTERATIONS GENETIQUES PROVOQUEES PAR L'ACIDE NITREUX SUR LE
DNA TRANSFORMANT.

Souche réceptrice : R6X nov-r; transformées *str^r-r* (O);
mutants *fus^r-r* (Δ).

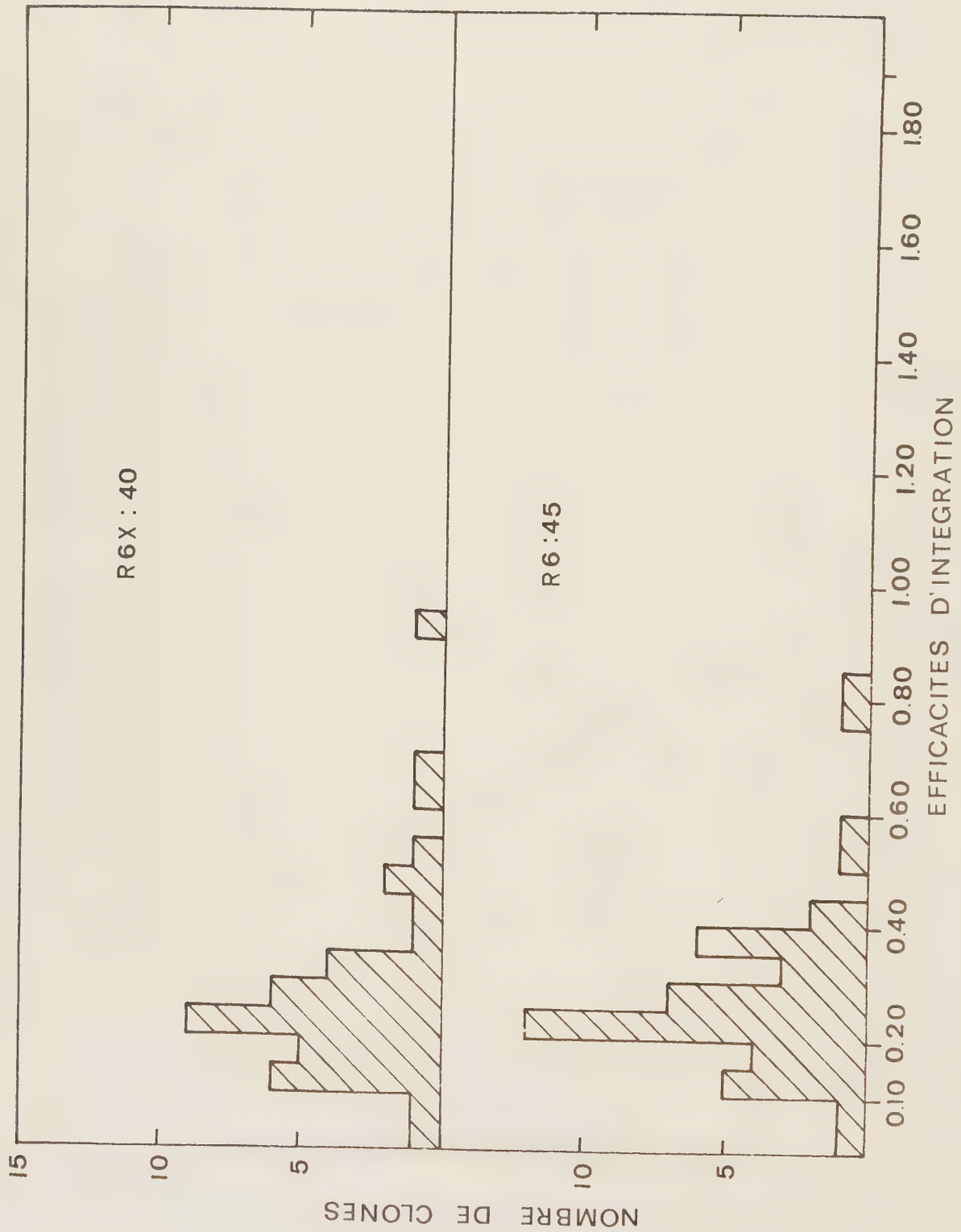


Figure 27 - DISTRIBUTION DES EFFICACITES D'INTEGRATION DES MUTATIONS $f_{4s-\gamma}$ INDUITES PAR L'HYDROXYLAMINE DANS LES SOUCHES hex^+ ET hex^- .

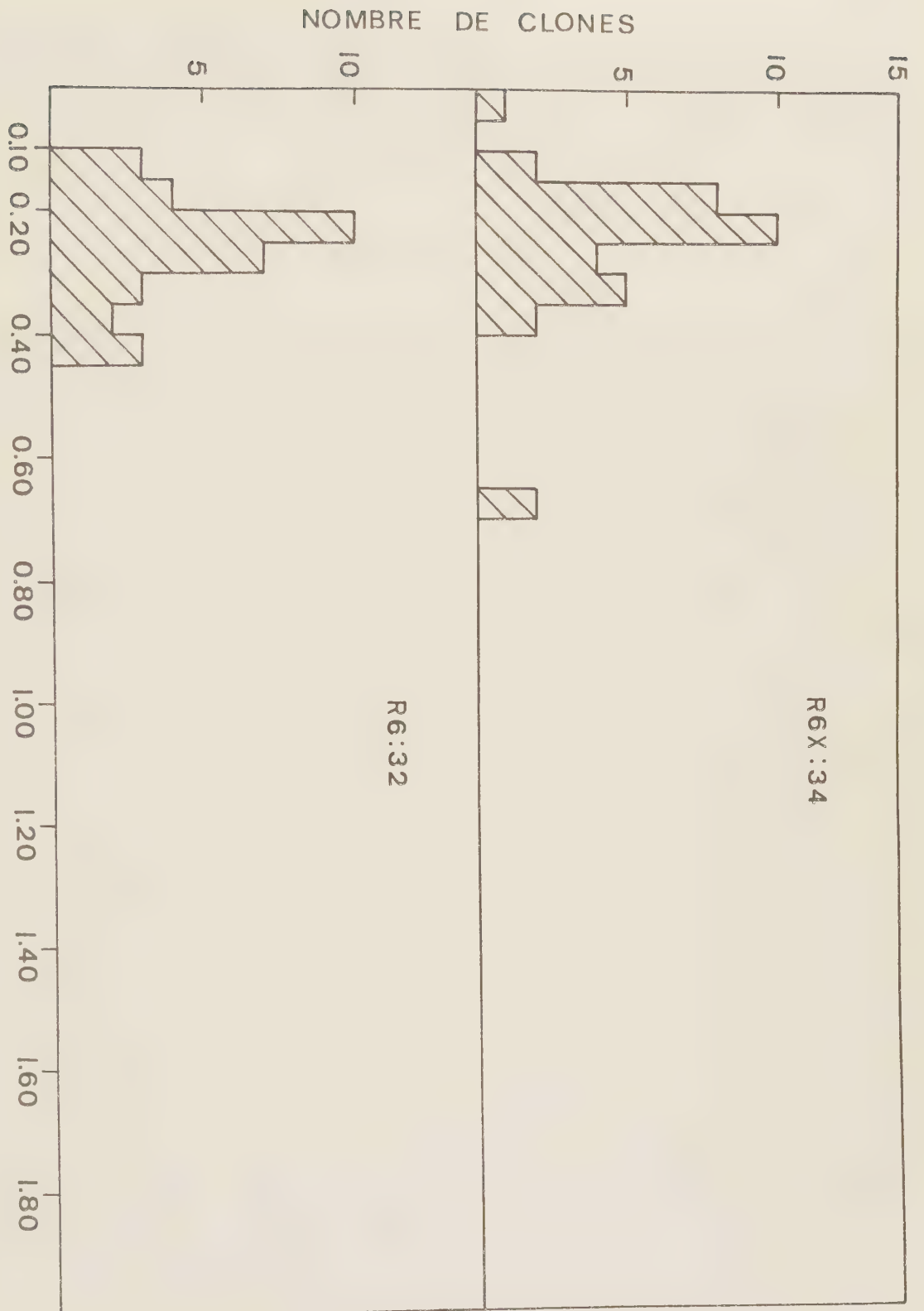


Figure 28 - DISTRIBUTION DES EFFICACITES D'INTEGRATION DES MUTATIONS his^{-} INDUITES PAR L'ACIDE NITREUX DANS LES SOUCHES his^{+} ET his^{-} .

plusieurs marqueurs *fus-r* dont les efficacités sont supérieures à 0,25, avec le nombre de transformées pour le marqueur à faible efficacité *nov-r* 1. Comme attendu, parmi les 8 marqueurs examinés, 7 possèdent des efficacités égales à celui de *nov-r* 1 et un seul possède une efficacité supérieure.

DISCUSSION

Le traitement du DNA transformant à l'hydroxylamine ou à l'acide nitreux conduit à une inactivation de l'activité biologique de ce DNA. Les activités biologiques des marqueurs LE et HE diminuent avec pratiquement la même vitesse dans les souches discriminantes (64) et au même taux qu'un marqueur HE dans la souche non discriminante. Contrairement aux lésions UV qui entraînent une hypersensibilité des marqueurs LE par comparaison aux marqueurs HE (26- 57 - 112), les altérations chimiques provoquées par l'action de l'acide nitreux ou de l'hydroxylamine ne semblent pas avoir d'effet sur l'activité de la fonction hex.

Des mutants peuvent être isolés après transformation des souches de pneumocoques avec du DNA traité par l'acide nitreux ou l'hydroxylamine. Les mutants produits par ces agents chimiques sont en grande majorité de la classe des transitions représentant le changement de la paire de base de C : G vers T : A et même de T : A vers C : G pour l'acide nitreux (22). Afin d'identifier la spécificité de la fonction hex, nous avons traité le DNA avec l'acide nitreux ou l'hydroxylamine et nous avons examiné la fréquence des mutations *fus-r* qui apparaissent après transformation des souches R6 et R6X. En plus, nous avons déterminé les classes d'efficacité de nombreux mutants induits par l'un ou l'autre mutagène. La fréquence des mutants qui apparaissent par suite de l'exposition du DNA à ces deux agents mutagènes est la même dans les deux souches réceptrices. Les altérations chimiques qui entraînent la baisse de l'activité biologique à celles qui entraînent l'apparition de mutants ne semblent être sujettes à l'action de la fonction hex. Cette conclusion est à première vue surprenante puisque les mutants *fus-r* qui ont été isolés après transformation des souches hex^+ ou hex^- par du DNA traité chimiquement, appartiennent pratiquement tous à la classe LE (Figures 27 et 28). Des mutations à d'autres loci, induites par un traitement identique, sont toutes, à faible efficacité (103 - 58 - 36). Par contre, nous avons vu que les mutations spontanées qui apparaissent dans le locus *fus* de la souche hex^+ sont presque exclusivement à forte efficacité (Chapitre IV, 116).

L'action de l'acide nitreux ou de l'hydroxylamine provoque des mutations du type des transitions. Comme ces mutations sont à faible efficacité, nous pouvons déduire que le processus de discrimination des souches hex^+ reconnaît et élimine préférentiellement les bases mal appariées du type A : C et G : T. D'autre part

comme les mutations ponctuelles peuvent être à forte efficacité (HE), si nous admettons que toutes les transitions sont des mutations à faible efficacité (LE), il est clair qu'un type au moins de transversion correspond aux mutations HE. Si la distorsion provoquée dans la double hélice par des paires de bases mal appariées du genre transversion est plus grande que celle provoquée par des paires de bases mal appariées du genre transition, il s'ensuit que la spécificité de la nucléase responsable de la discrimination n'est pas déterminée par l'importance de la distorsion.

Le comportement de la souche non discriminante vis à vis du DNA transformant traité par l'hydroxylamine ou l'acide nitreux appelle des commentaires supplémentaires. Le DNA traité par ces agents, renferme certaines bases modifiées et l'intégration conduit vraisemblablement à la formation de structures hétéroduplex dans le génome récepteur renfermant ces bases modifiées. La similarité des taux d'inactivation et du niveau de mutagénèse dans les souches discriminantes et non discriminantes, suggère que ni les modifications chimiques responsables de l'apparition des mutants, ni leurs produits de duplication ne sont reconnus par le processus de discrimination.

3ème PARTIE

NATURE MOLECULAIRE DU PROCESSUS DE DISCRIMINATION

CHAPITRE VII

ABSENCE DE RELATION ENTRE L'INTEGRATION DES MARQUEURS LE
ET LA FOURCHE DE DUPLICATION

Nous avons vu que l'information des marqueurs LE est transmise aux deux brins du DNA des bactéries réceptrices alors que l'information des marqueurs HE n'est transmise qu'à un seul brin (40 - 68 - 69 - 70 - 119 - Chapitre II). Les événements moléculaires qui aboutissent à l'homozygotie des marqueurs LE peuvent être de deux sortes, si on élimine une hypothèse incompatible avec de nombreux résultats expérimentaux (40 - 69 - 102), celle de l'insertion en double brin dans le génome récepteur.

1°) - Les marqueurs LE sont intégrés par l'intermédiaire d'une insertion d'un brin du DNA donateur dans le génome récepteur, suivie d'une correction des bases mal appariées par un mécanisme d'excision et de synthèse réparatrice (25).

2°) - Les marqueurs LE sont intégrés juste avant une fourche de duplication qui par sa progression le long du chromosome va rapidement transformer l'hétérozygote en homozygote.

Au cours de cette étude, nous nous sommes attachés à tester cette dernière possibilité qui permettait de proposer une explication des faibles efficacités et que l'on a décrit dans "L'INTRODUCTION". Les caractéristiques primordiales de cette hypothèse sont les suivantes : les transformées LE viables seraient celles qui auraient échappé à la destruction par une endonucléase spécifique des hétérozygotes LE, grâce à une fourche de duplication. Les homozygotes LE et les hétérozygotes HE ne seraient pas sujets à l'action de cette enzyme, et pour cette raison l'intégration des marqueurs HE serait indépendante de la position de la fourche de duplication.

Les seuls résultats expérimentaux publiés, en désaccord avec ce modèle, étaient ceux de l'analyse clonale effectuée par LOUARN et SICARD (68). Cependant, leurs résultats, incompatibles avec cette hypothèse dans le cas d'une progression unidirectionnelle de la fourche de duplication, devenaient nettement moins défavorables à cette hypothèse dans le cas, non encore exclu ou confirmé, d'une direction bidirectionnelle de la duplication du chromosome. C'est pourquoi nous avons essayé de trouver des arguments expérimentaux en faveur ou en défaveur de ce modèle, par des méthodologies différentes.

L'arrêt de la synthèse de DNA au cours de la transformation devrait dimi-

nuer sélectivement le nombre de transformées pour un marqueur LE. Selon cette hypothèse, l'apparition de bactéries doublement transformées pour deux marqueurs LE indépendants dépendrait de la présence de plusieurs fourches de duplication. La probabilité d'incidence de ces doubles événements devrait donc être encore plus sensible à l'inhibition de la synthèse du DNA. Le composé 6 - (p - hydroxyphénylazo) - uracile (HPUra) qui bloque la synthèse semi-conservatrice du DNA dans les bactéries gram positif nous a permis d'examiner cette possibilité.

Une autre façon de tester cette hypothèse est de séparer le DNA synthétisé pendant la transformation, du DNA non dupliqué et d'examiner la distribution des activités LE et HE dans ces DNA. Leur séparation peut être réalisée grâce à l'alourdissement du DNA synthétisé dans un milieu contenant des isotopes lourds et au fractionnement dans un gradient de densité. Les deux types d'expériences mentionnées au-dessus ont été réalisés et les résultats expérimentaux sont présentés ici.

MATERIELS ET METHODES

Milieu contenant des isotopes lourds : Ce milieu renferme pour 100 ml d'eau distillée : 300 mg de (C^{13}) glucose (substitué à 56,5 % en C^{13} ; MERCK, SHARP et DOHME, CANADA) 10 mg d'un mélange d'acides aminés marqués par (N^{15} et C^{13}) (MERCK, SHARP et DOHME, CANADA), 0,1 mg d'extrait cellulaire d'algues marqué par (N^{15} et C^{13}), 200 mg de chlorure d'ammonium (substitué à 98 % en N^{15} , ISOMET), 500 mg NaCl, 40 mg KCl, 12 mg Na_2HPO_4 , 1 mg de tryptophane, 5 mg de pyruvate de sodium, 5 mg d'albumine ARMOUR BOVINE fraction V, 0,1 μ M de nicotinamide, 10 μ M de pantothénate de calcium, 3 μ M de pyridoxal HCl, 1 μ M riboflavine, 2 μ M de thiamine et 10 μ M d'acide p-aminobenzoïque ; il contient également $MgSO_4$, 0,2 mM ; $CaCl_2$, 0,1 mM ; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 M ; et Tris HCl 40 mM pH 7,5.

Cette solution est stérilisée par filtration à travers une membrane (MILLIPORE) et conservée à -20° .

Mesure de l'incorporation de la thymidine : Les cellules dégelées de la souche R6 *str-r 41, nov-r 1, Thy A, Thy B* sont diluées au vingtième dans le milieu de transformation (CH) dépourvu d'uridine et d'adénosine mais supplémenté avec 10 μ g/ml de thymidine. Après 60 minutes d'incubation à 37° correspondant au temps 0 de la Figure 29, 20 μ C de 3H de thymidine sont ajoutés à la culture. Trente minutes plus tard, la culture est divisée en deux lots identiques, l'un recevant 25 μ g/ml de 6-(p-hydroxyphénylazo)-uracile (HPUra) (gracieusement fournie par NEAL BROWN, BALTIMORE) d'une solution à 5 mg/ml en milieu alcalin (NaOH 0,1 M). Les deux cultures sont incubées à 37° . La radioactivité incorporée dans la fraction insoluble

dans l'acide trichloroacétique froid et le nombre de centres formateurs de colonies sont déterminés à 10 minutes d'intervalle dans ces cultures.

La thymidine incorporée est mesurée de la façon suivante : des échantillons de 0,2 ml sont précipités par de l'acide trichloroacétique sur une membrane (MILLIPORE). Les filtres sont séchés et comptés dans du Liquasol (NEW ENGLAND NUCLEAR CORP) dans un compteur à scintillation liquide.

Transformation en présence de HPURa : Les cellules de la souche R6 sont amenées au maximum de compétence par croissance des cellules dans 10 ml de milieu CH à 37° pendant 120 minutes puis à 30° pendant 10 minutes. La culture est divisée en deux aliquots, l'un de 7,5 ml et l'autre de 2,5 ml. Les deux cultures sont mélangées avec un volume égal de milieu CH préchauffé (30°), le volume le plus important contenant 50 µg/ml de HPURa. Après 10 minutes d'incubation à 30° on ajoute le DNA de la souche R6 sulf-d, str-r 41, nov-r 1, rif-r 17, opt-r 2, bac-r 3. La pénétration du DNA est terminée 20 minutes plus tard par l'addition de désoxyribonucléase (25 µg/ml). Après 5 minutes d'incubation pour la culture contrôle et 20 minutes pour la culture traitée avec le HPURa, les cellules sont sédimentées, lavées une fois dans le milieu B et remises en suspension dans le même volume initial de milieu B. Les transformées sont sélectionnées par la méthode de la double couche.

Expériences de transfert de densité :

a) - *Première transformation*. Les cellules dégelées de la souche R6 *ery-r 2* sont diluées au vingtième dans 15 ml de milieu CH et incubées à 37° pendant 130 minutes, puis 10 minutes à 30°. La culture est centrifugée rapidement au froid (10 000 rpm, 5 minutes), les cellules sont lavées par 2 ml de milieu froid "lourd" puis le dernier culôt est remis en suspension dans 16 ml de milieu "lourd" préchauffé (30°), contenant 20 µC de ³²P sous forme de phosphate. Après 10 minutes d'incubation à 30°, on ajoute 1 µg/ml de DNA de la souche R6 *str-r 41, nov-r 1* à la culture et on continue l'incubation pendant 30 minutes. La désoxyribonucléase est ajoutée et la culture est incubée à 37°. Puis on prélève un échantillon de 5 ml aux temps 5, 30 et 60 minutes.

b) - *Réextraction du DNA*. Les cellules de chacun des trois échantillons sont sédimentées par centrifugation, lavées une fois avec NaCl 0,15 M, EDTA 0,01 M (pH 8,0) et remises en suspension dans 0,5 ml de la même solution saline. Les cellules sont lysées par l'addition de désoxycholate de sodium (0,01 %) et du sulfate de dodécyle de sodium (0,02 %) et incubées à 37°. On ajoute 100 µg de ribonucléase pancréatique et 100 unités de ribonucléase T1 puis on prolonge l'incubation pendant 1 heure. Puis on ajoute de la pronase chauffé au préalable (60°, 20 minutes) (200 µg/ml) et on incube ce lysat à 45° pendant 4 heures, avant de le dialyser toute la nuit contre la solution NaCl-EDTA.

c) - *Fractionnement du DNA dans un gradient de chlorure de césium*

Les gradients de densité de CsCl sont préparés de la façon suivante : la totalité du DNA de chaque échantillon (4 ml) dans NaCl 0,15 M, EDTA 0,01 p_H 8,0 est mélangé avec 4,9 g de chlorure de césium (optical grade, HARSHAW CHEMICAL CO, CLEVELAND) dans un tube de polyallomère. La densité finale de la solution est ajoutée à 1,70 g/cm³ puis les tubes sont remplis avec de l'huile minérale. Les tubes sont centrifugés pendant 50 heures dans un rotor angulaire fixe (50 Spinco) à 37000 révolutions /mn et à la température de 20°. On perce le fond de chaque tube avec une aiguille et des fractions de 1 goutte sont collectées dans 0,2 ml de la solution stérile NaCl 0,01 M, EDTA 0,001 M.

d) - *Mesure de la radioactivité* : Les échantillons radioactifs (20 µl) sont déposés sur un papier filtre de 21 mm (CARL SCHLEICHER et SCHUELL) et séchés avec une lampe chauffante. On lave les papiers filtres deux fois avec de l'acide trichloroacétique froid à 5 %, 15 à 20 minutes chaque fois, et une fois avec de l'alcool froid. Les disques de papier secs sont alors immergés dans 5 ml de fluide de scintillation (Liquasol).

e) - *Détermination de l'activité biologique* : Les activités des deux marqueurs du DNA donateur (*str-r* 41 et *nov-r* 1) et du marqueur de la bactérie réceptrice (*ery-r* 2) sont mesurées dans la souche réceptrice RX sensible aux trois antibiotiques. Des échantillons de DNA (10 à 50 µl) de chaque gradient sont mélangés avec 1 ml de cellules compétentes, pendant 30 minutes à 30°. Après l'addition de 5 ml de milieu B on incube les cultures pendant 2 heures à 37°.

RESULTATS

EXPERIENCES GENETIQUES IMPLIQUANT LA TRANSFORMATION DES CELLULES HEX⁺ BLOQUEES DANS LEUR SYNTHÈSE DE DNA PAR LE 6(_P-HYDROXYPHENYLAZO) URACILE.

La figure 29 représente l'effet du HPURa sur l'incorporation de la thymidine marqué et sur la viabilité des cellules de pneumocoque exigeantes en thymidine. L'arrêt presque immédiat de l'incorporation de thymidine atteste que l'antimétabolite arrête la synthèse du nouveau DNA sans qu'il en résulte une perte significative de la viabilité des cellules dans les temps retenus pour cette expérience. Le résultat de la transformation des cellules de R6 par du DNA extrait de la souche R6 portant divers marqueurs en présence ou en absence de HPURa est indiqué dans le tableau 22. Le HPURa réduit le nombre de transformées par comparaison à la culture contrôle. Nous n'avons pas recherché si cet effet provenait d'une

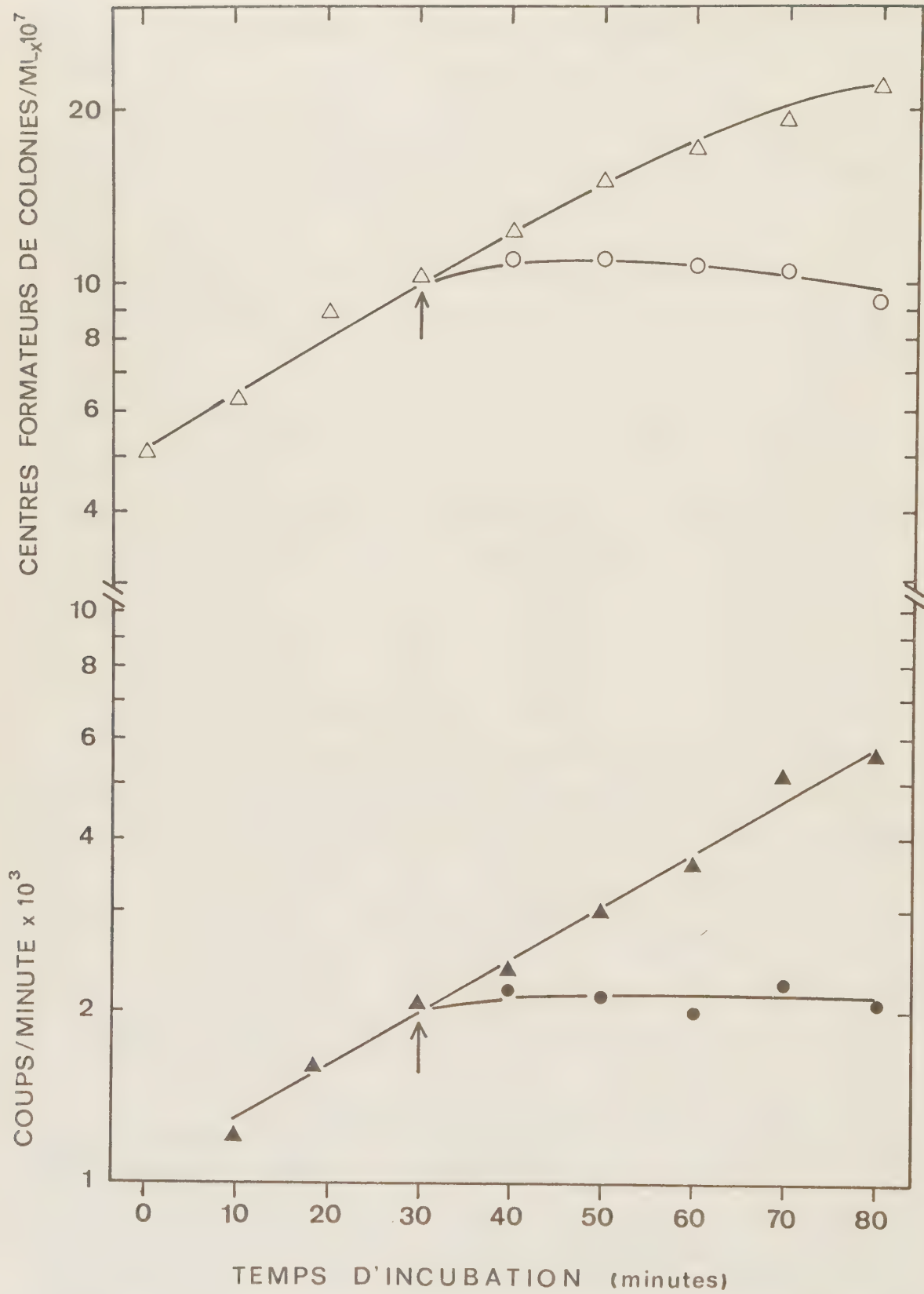


Figure 29 - EFFET DU HPura SUR L'INCORPORATION DE LA THYMIDINE ET SUR LA VIABILITE DES CELLULES EN PHASE DE CROISSANCE DE LA SOUCHE R6.

NOMBRE DE TRANSFORMÉES POUR UN SEUL MARQUEUR ET DEUX MARQUEURS INDEPENDANTS DANS LA TRANSFORMATION DES CELLULES R6 EN ABSENCE OU EN PRESENCE DE HPURA

TABEAU 22

Détermination	- HPURA		+ HPURA	
	Centres formateurs de colonies/ml		Centres formateurs de colonies/ml	
Nombre total de cellules	1,55 x 10 ⁸		1,25 x 10 ⁸	
Simple transformées		Simple/str-r41		Simple/str-r41
str-r41	7,4 x 10 ⁶	1	9,8 x 10 ⁵	1
sulf-d	9,6 x 10 ⁵	1,3	1,4 x 10 ⁶	1,4
nov-r1	7,5 x 10 ⁵	0,10	1,2 x 10 ⁵	0,12
opt-r2	1,35 x 10 ⁶	0,18	1,45 x 10 ⁴	0,15
rif-r17	8,0 x 10 ⁵	0,11	9,75 x 10 ⁵	0,10
bac-r3	8,75 x 10 ⁵	0,12	1,75 x 10 ⁵	0,18
Double transformées		Double/sulf-str		Double/sulf-str
sulf-str	7,8 x 10 ⁵		1,55 x 10 ⁴	
nov-opt	2,4 x 10 ³	0,3 x 10 ⁻²	35 (175/5ml)	0,2 x 10 ⁻²
nov-rif	1,7 x 10 ³	0,2 x 10 ⁻²	40 (160/4ml)	0,3 x 10 ⁻²
nov-bac	1,75 x 10 ³	0,2 x 10 ⁻²	59 (237/4ml)	0,4 x 10 ⁻²

diminution équivalente du nombre de cellules compétentes ou d'une diminution de l'activité transformante du DNA ayant pénétré dans les cellules ou même ces deux raisons à la fois. Cependant nous voyons que les efficacités d'intégration des marqueurs examinés sont préservées en présence de l'inhibiteur. De même le HPURa n'a aucun effet significatif sur le nombre de bactéries transformées pour deux marqueurs LE indépendants.

EXPERIENCES PHYSICO-CHIMIQUES IMPLIQUANT LE TRANSFERT DES CELLULES COMPÉTENTES DANS UN MILIEU CONTENANT DES ISOTOPES LOURDS.

Les cellules de la souche R6 ery-2 devenues compétentes dans le milieu CH sont transférées dans un milieu contenant les isotopes lourds ^{15}N et ^{13}C et après 10 minutes d'incubation pour permettre l'épuisement du pool interne des nucléotides, sont mises en contact avec un DNA portant un marqueur HE (*str-r 41*) et LE (*nov-r 1*). La transformation à 30° (30 minutes) est suivie d'une croissance des cellules à 37°. Le DNA est extrait de la population transformée et est sédimenté à l'équilibre dans un gradient de chlorure de césium. D'après notre hypothèse de travail, les prévisions sont les suivantes : le DNA nouvellement synthétisé, hybride en densité et donc occupant une position distincte dans le gradient devrait être enrichi en activité LE par rapport à l'activité HE alors que, au contraire, le DNA léger non dupliqué devrait être appauvri en activité LE. La Figure 30 représente le profil de sédimentation du DNA dans trois gradients correspondant aux temps 5, 30 et 60 minutes d'incubation à 37° après l'arrêt de la transformation par la désoxyribonucléase. La distribution dans les gradients du DNA des bactéries réceptrices est déterminée par la mesure de l'activité biologique du marqueur *ery-r 2*. La position présumée du DNA dupliqué en milieu "lourd" est fournie par le pic de radioactivité. Dans ces conditions expérimentales, approximativement 5 %, 50 % et 75 % du génome des bactéries réceptrices a été dupliqué dans le milieu "lourd". Le Tableau 23 résume les résultats obtenus à partir des fractions des trois gradients. Le DNA portant l'activité du marqueur LE ne devient pas hybride plus rapidement que le DNA portant l'activité HE.

CONCLUSION

Ainsi les résultats des deux types d'expérience, dans leur ensemble permettent d'aboutir à la même conclusion : les marqueurs LE ne s'intègrent pas préférentiellement au voisinage de la fourche de duplication dans les souches discriminantes.

Dans le chapitre suivant nous décrirons des résultats expérimentaux qui

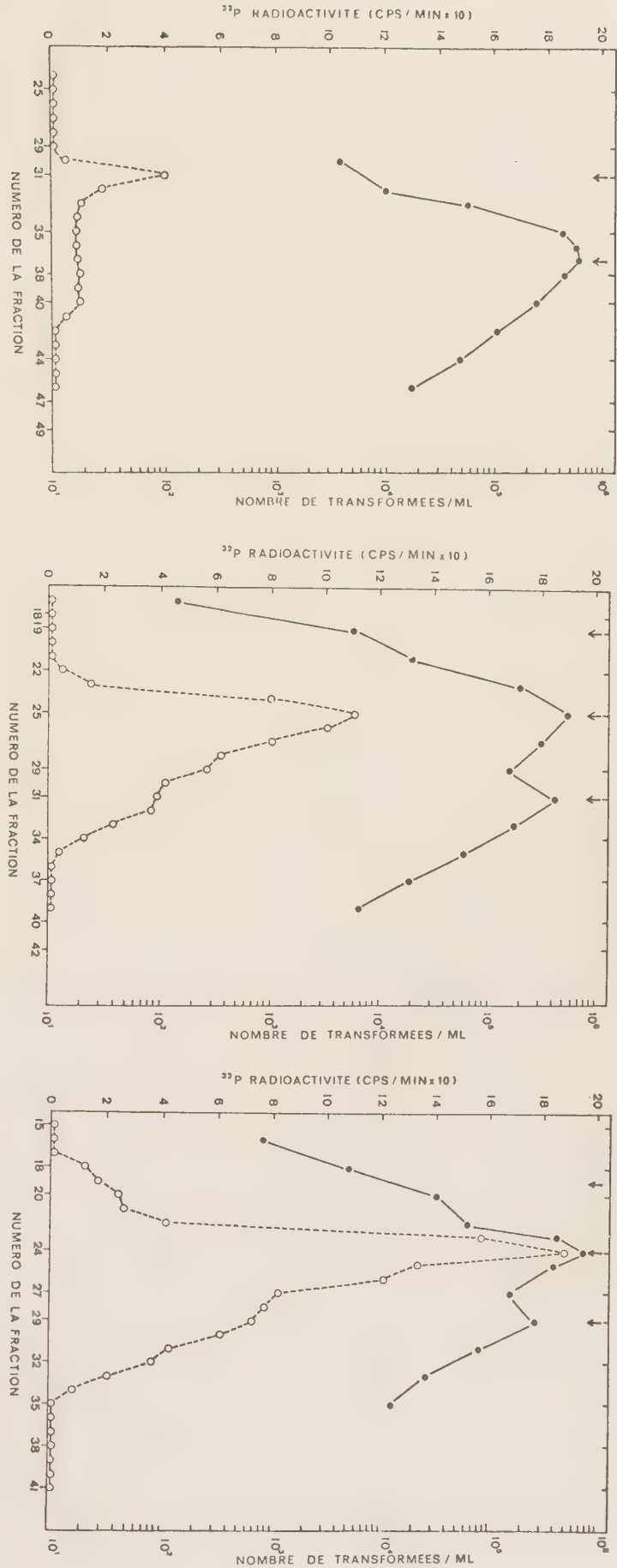


Figure 30 - SEDIMENTATION DANS UN GRADIENT DE DENSITE DE CsCl DU DNA REEXTRAIT A DES TEMPS DIFFERENTS APRES TRANSFORMATION DE LA SOUCHE R6.

Le DNA est réextrait soit 5 minutes après le début de traitement de la culture transformée en milieu lourd par la DNase pancréatique (gradient de gauche), 30 minutes (gradient du milieu), ou 90 minutes (gradient de droite). La distribution du DNA récepteur dans les trois gradients est déterminée par mesure de l'activité du marqueur *ery-r²* dans la souche RX (●). La position de la radioactivité ^{32}P (○) indique la position du DNA hybride.

TABEAU 23

Activités relatives des marqueurs LE et HE dans le DNA dupliqué et non dupliqué des bactéries venant d'être transformées

Temps d'incubation de la culture trans- formée (minutes)	% du génom dupliqué	Fraction de densité hybride (DNA dupliqué)		Fraction de densité légère (DNA non dupliqué)		$\frac{nov-r}{str-r}$
		Transformées <i>str-r</i> (HE)	Transformées <i>nov-r</i> (LE)	Transformées <i>str-r</i> (HE)	Transformées <i>nov-r</i> (LE)	
5	1-5 %	$5,1 \times 10^2$	82	$7,2 \times 10^3$	11×10^2	0,15
30	50 %	$8,5 \times 10^3$	14×10^2	$7,8 \times 10^3$	12×10^2	0,16
60	75 %	$7,0 \times 10^3$	11×10^2	$4,6 \times 10^3$	8×10^2	0,18

Le DNA isolé à partir de la culture transformée a donné un rapport d'activité
donateur HE (*str-r*) de 2×10^{-3} et un rapport d'activité $\frac{\text{donateur LE } (nov-r)}{\text{donateur HE } (str-r)}$ de 0,19. La duplication du
génom est estimée d'après la quantité relative d'activité de transformation (*ery-r*) apparaissant à la position
de densité hybride du gradient de chlorure de césium.

apportent des arguments en faveur de l'autre hypothèse, celle faisant intervenir un mécanisme de correction par excision et synthèse pour les marqueurs LE.

CHAPITRE VIII

AUGMENTATION DU POUVOIR DE DISCRIMINATION
AVEC DU DNA TRANSFORMANT FRAGMENTE

Dans son hypothèse pour expliquer l'effet marqueur chez le pneumocoque et tous les faits qui lui sont associés, EPHRUSSI-TAYLOR (25) fait intervenir un mécanisme de correction. La fonction hex, active dans les souches discriminantes, est un système enzymatique qui reconnaît certaines paires de bases mal appariées, celles représentant les marqueurs LE, et provoque une cassure endonucléolytique sur un seul brin, au site de l'hétérozygote. Les paires de bases mal appariées, formées par une mutation HE ne sont pas reconnues par la fonction hex. Cet événement est suivi de l'excision d'une portion du brin puis d'une synthèse réparatrice, qui en utilisant le brin complémentaire comme matrice, réétablit la continuité du génome de la bactérie. L'excision est extensive ce qui provoque l'exclusion des mutations HE par une mutation LE. EPHRUSSI-TAYLOR explique le facteur 10 de différence entre les efficacités d'un marqueur LE et d'un marqueur HE par l'élimination du brin exogène préférentiellement au brin endogène. Cependant nous pouvons également concevoir que dans le cadre de cette hypothèse, les différences dans les efficacités pourraient provenir de l'existence d'événements létaux associés aux seuls marqueurs LE. Un type d'événement léthal auquel nous pensons est par exemple la rupture du DNA récepteur par cassure en un même point des deux brins du DNA. Nous présenterons dans ce chapitre des résultats expérimentaux qui pourraient être favorables à cette possibilité. La réduction artificielle du poids moléculaire du DNA transformant diminue considérablement l'efficacité relative d'intégration des marqueurs à faible efficacité dans la souche discriminante. Nous proposerons une hypothèse légèrement modifiée par rapport à celle d'EPHRUSSI-TAYLOR qui permet d'expliquer cet effet par une élévation de la fréquence d'événements létaux associés aux marqueurs LE consécutifs à une réduction de la longueur du brin inséré dans le DNA récepteur.

MATERIELS ET METHODES

Souches : La souche R6X *nov-r* utilisée jusqu'à présent (voir origine de la souche, chapitre IV) est rendue novobiocine sensible par transformation. Sauf dans les cas mentionnés dans le texte, nous utiliserons cette souche R6X *nov*^s et la sou-

che R6. Les DNA donateurs sont extraits de la souche 119 et des souches R6X portant le marqueur *sulf-d* en combinaisons variées avec plusieurs marqueurs de résistance à des antibiotiques

Sélection des transformées : Dans les conditions publiées antérieurement (44), la sélection des transformées *sulf-d* est entravée par un nombre élevé de cellules. Cependant, en utilisant une culture transformée dégelée et en augmentant la concentration de sulfanilamide (250 µg/ml) dans du milieu B gélosé, il est parfaitement possible de sélectionner les transformées *sulf-d* jusqu'à une densité de 10^7 C. F. C. par boîte. Lorsque le nombre de transformées est faible dans une expérience donnée, le nombre de mutants spontanés présentant le même phénotype que le marqueur sélectionné est toujours déterminé à partir de la culture contrôle non exposée au DNA. Lorsque le nombre de transformées est tel qu'une densité élevée de cellules doit être étalée, la sélection est toujours effectuée à partir d'une culture congelée à -70° . Dans ce cas la sélection des transformées est en effet facilitée, car des bactéries dégelées sont beaucoup plus sensibles que des cellules en croissance à l'action des antibiotiques alors que les transformées se développent normalement pour former une colonie.

Fractionnement du DNA dans un gradient de saccharose : Des gradients linéaires de 5 % à 20 % de saccharose (4,8 ml) (77) dans NaCl 1 M, Tris 10^{-2} , EDTA 10^{-3} M (pH 8,0) sont préparés dans des tubes de nitrocellulose. On mélange un échantillon de DNA fragmenté, marqué par le tritium avec 25 µl de DNA de référence extrait de *E. Coli* marqué par C^{14} . Le mélange de DNA (0,2 ml) est déposé avec précaution sur le gradient et centrifugé dans un rotor SPINCO 50,1, à 20° . Le bas de chaque tube est percé avec une aiguille et des fractions de 3 gouttes sont collectées. Les fractions sont analysées pour la radioactivité après séchage des échantillons de 10 µl sur des disques de papier filtre, lavage des papiers une fois dans l'acide trichloroacétique et une fois dans l'alcool, et comptage des papiers séchés dans du Liquasol dans un spectromètre à scintillation liquide. Les fractions sont aussi analysées pour l'activité transformante. Une forte concentration de saccharose n'a aucun effet inhibiteur sur la transformation.

Le DNA de référence extrait de *E. Coli* marqué au C^{14} a été calibré, par ROSENTHAL et FOX (97) et conservé à -30° . Une échelle des poids moléculaires a été établie pour chaque gradient, considérant que la distance de migration pendant la centrifugation est proportionnelle au coefficient de sédimentation (77). Les coefficients de sédimentation sont convertis en poids moléculaires par la relation empirique de STUDIER (109).

RESULTATS

EFFET BIOLOGIQUE DE LA FRAGMENTATION DU DNA TRANSFORMANT.

La réduction du poids moléculaire du DNA transformant entraîne une diminution de l'activité biologique du DNA. CATO et GUILD (12) ont trouvé qu'avec une diminution de la taille du DNA, dans leur souche non discriminante RX, l'activité des marqueurs examinés déclinait approximativement dans les mêmes proportions. Nous avons examiné l'effet de la longueur des molécules de DNA sur l'activité des marqueurs d'efficacité d'intégration différentes, dans notre souche non discriminante mais aussi dans la souche discriminante. Une préparation de DNA portant des marqueurs bien caractérisés est soumise à l'action de lames tournantes à très grande vitesse dans des conditions décrites dans la section "MATÉRIEL ET MÉTHODES" du chapitre V (89). A la suite de traitement, l'activité transformante du DNA chute dans les deux souches (Figure 31), d'abord rapidement puis plus lentement avec des temps croissants. Dans la souche R6 les marqueurs à faible efficacité *opt-r 2* et *str-r 53* montrent une plus grande sensibilité à l'inactivation que ne le font les deux autres marqueurs. Le marqueur *ery-r 2* dont l'efficacité est la moitié de celle du marqueur *sulf-d* manifeste une sensibilité intermédiaire. Dans la souche non discriminante, les marqueurs *sulf-d* et *opt-r 2* ont un taux d'inactivation approximativement identique alors que les marqueurs *ery-r 2* et *str-r 53* sont légèrement plus sensibles. Ainsi le comportement différent des souches R6 et R6X à la réduction du poids moléculaire du DNA suggère que la sensibilité des marqueurs peut être reliée au processus de discrimination. Le niveau de discrimination de la souche hex^+ semble avoir été amplifié par la fragmentation du DNA transformant. Puisque les fragments de DNA produit par l'action des lames tournant à grande vitesse sont hétérogènes en taille (12), le DNA fragmenté est fractionné par sédimentation dans des gradients de saccharose. On détermine les efficacités relatives d'intégration des fragments de différentes tailles dans les souches R6 et R6X. La souche R6X fournit le contrôle nécessaire permettant d'affirmer que les différences observées sont réellement dues à l'activité de la fonction *hex*. On peut en effet s'attendre à ce que les mutations multisites par exemple soient plus sensibles à la fragmentation que les mutations ponctuelles, dans les deux souches réceptrices.

DISCRIMINATION DES MARQUEURS EN FONCTION DE LA LONGUEUR DE LA MOLECULE DE DNA.

Le DNA extrait de la souche 119 marqué au tritium et de poids moléculaire

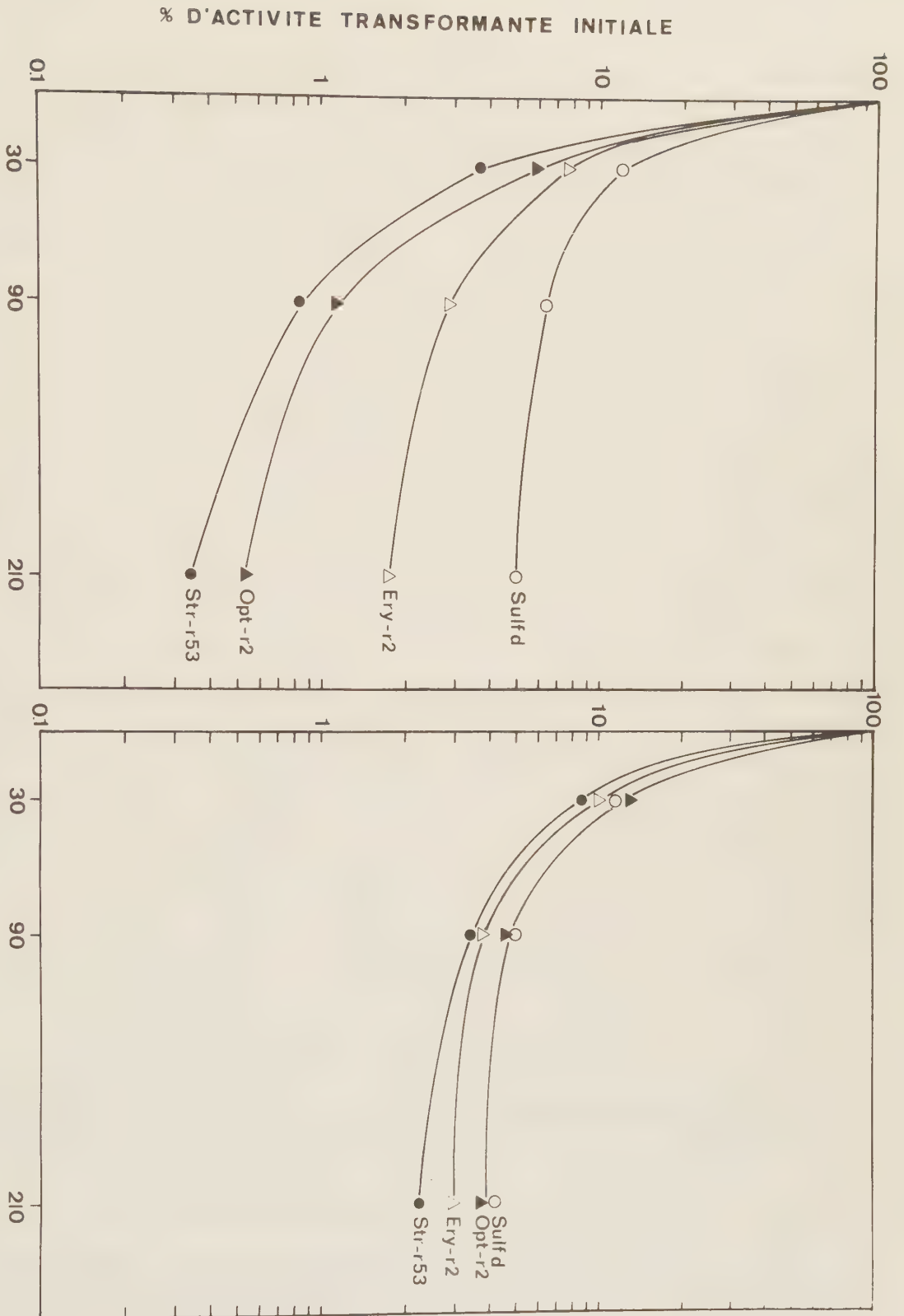


Figure 31 - INACTIVATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DU DNA PAR FRAGMENTATION.

Le DNA est fragmenté par la rotation à très grande vitesse de lames dans la solution saline du DNA. L'activité biologique du DNA est mesurée dans la souche hex⁺, R6 et dans la souche hex⁻, R6X *nov-r*.

d'environ 2×10^7 daltons est fragmenté par la technique décrite plus haut, mélangé avec le DNA de référence de *E. Coli* et sédimenté dans un gradient de saccharose. La Figure 32 représente le profil de la radioactivité obtenu après centrifugation. Le nouveau coefficient de sédimentation du DNA, déterminé par la position moyenne de la radioactivité H^3 a été réduit jusqu'à une valeur de 10,9 S, ce qui correspond à un poids moléculaire de $1,1 \times 10^6$ daltons. Les efficacités relatives d'intégration de divers marqueurs dans la souche R6 sont mesurées à partir du DNA non fractionné, du DNA de la fraction 12 (fraction médiane) et des fractions 9 et 15 (fractions latérales du pic de radioactivité) (Tableau 24). La fragmentation du DNA conduit à une amplification de la discrimination entre les marqueurs d'efficacités différentes, mais le fractionnement n'a aucun effet additif sur le niveau de la discrimination. Les efficacités relatives des marqueurs sont pratiquement les mêmes avec le DNA des trois fractions testées. L'observation directe au microscope électronique des DNA fractionnés a montré que ceux-ci étaient encore très hétérogènes en taille (courtoisie de Sandro Fornili). Aussi les fractions de bas coefficient de sédimentation sont rassemblées, concentrées et centrifugées à nouveau. La distribution de la radioactivité H^3 est montrée dans la Figure 33. Comme prévu, la position médiane du DNA de pneumocoque s'est légèrement déplacée vers les plus faibles taux de sédimentation. Les efficacités d'intégration des marqueurs portés par les DNA des fractions paires de 10 à 18 sont mesurées par transformation des cellules à leur maximum de compétence des souches R6 et R6X. Comme le nombre de transformées est faible pour ces fractions nous avons sélectionné seulement deux des marqueurs LE, *nov-r 1* et *stg-r F*. Les mutations spontanées sont absentes aux concentrations d'antibiotiques utilisés dans ces expériences pour sélectionner les transformées *nov-r 1* (8 µg/ml) et *stg-r F* (10 µg/ml). Les efficacités relatives d'intégration de 4 marqueurs, comparées à celle du marqueur *sulf-d* sont indiquées dans la Figure 34. Dans la souche non discriminante les efficacités des marqueurs examinés, sont pratiquement indépendante du poids moléculaire du DNA transformant. La réduction de l'efficacité relative du marqueur *str-r 41* traduit vraisemblablement une sensibilité à la fragmentation due au caractère multisite de la mutation (98). Dans la souche discriminante, les efficacités d'intégration des deux marqueurs LE *nov-r 1* et *stg-r F* et des deux marqueurs HE *str-r 41* et *fus-r A* relatives au marqueur *sulf-d*, diminuent approximativement à la même vitesse jusqu'à un poids moléculaire proche de 10^6 daltons. En dessous de ce seuil, les efficacités relatives d'intégration des deux marqueurs HE restent constantes alors que celles des deux marqueurs LE continuent de baisser. Les faibles nombres de transformées ne permettent pas une évaluation quantitative de l'activité résiduelle des marqueurs LE pour des poids moléculaires inférieurs à 6×10^5 daltons. Cependant pour cette valeur, les marqueurs LE semblent être 1000 fois moins efficaces que le marqueur *sulf-d*. Cette réduction marquée de l'activité des marqueurs LE dépend

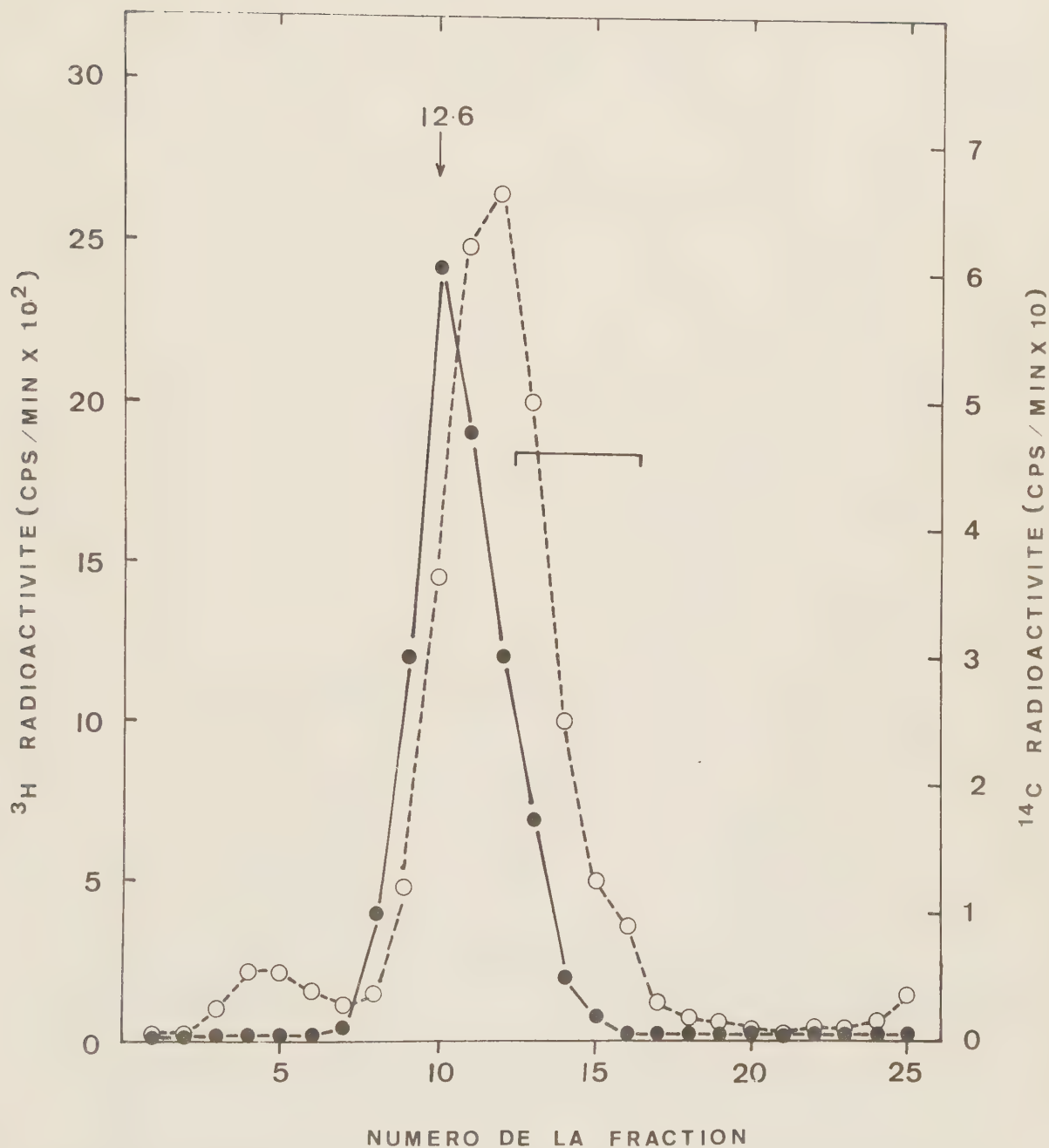


Figure 32 - GRADIENT DE SUCROSE DU DNA DE PNEUMOCOQUE FRAGMENTE ET MARQUE AU ³H ET DU DNA DE REFERENCE MARQUE AU ¹⁴C.

La flèche indique la position médiane et le $S_{20,w}$ du DNA de référence. Les gradients sont collectés après 19 heures de sédimentation à 26000 r.p.m dans un rotor SPINCO SW 50,1.

(O) radioactivité ³H. (●) radioactivité ¹⁴C.

TABLEAU 24

Efficacités d'intégration de plusieurs marqueurs de la souche 119 après transformation de la souche R6 avec du DNA natif et fragmenté

Marqueurs	DNA natif		DNA fragmenté non fractionné		Fraction 9		DNA fractionné Fraction 12		Fraction 15	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
<i>sulf-d</i>	29000	1	2300	1	320	1	870	1	200	1
<i>fus-r A</i>	20500	0,7	1050	0,46	140	0,44	400	0,46	75	0,38
<i>str-r 41</i>	19000	0,66	450	0,20	76	0,24	215	0,25	40	0,20
<i>stg-r F</i>	2300	0,08	45	0,02	12,0	0,04	275	0,03	3,6	0,02
<i>nov-r1</i>	2100	0,07	38,5	0,02	6,8	0,02	14	0,02	2,6	0,01
<i>rif-r 23</i>	2350	0,08	42	0,02	10,5	0,03	27	0,03	3,6	0,02

(1) Nombre de transformées x 10^2 /ml.

(2) Efficacité d'intégration (rapport entre le nombre de transformées pour un marqueur donné et le nombre de transformées *sulf-d*).

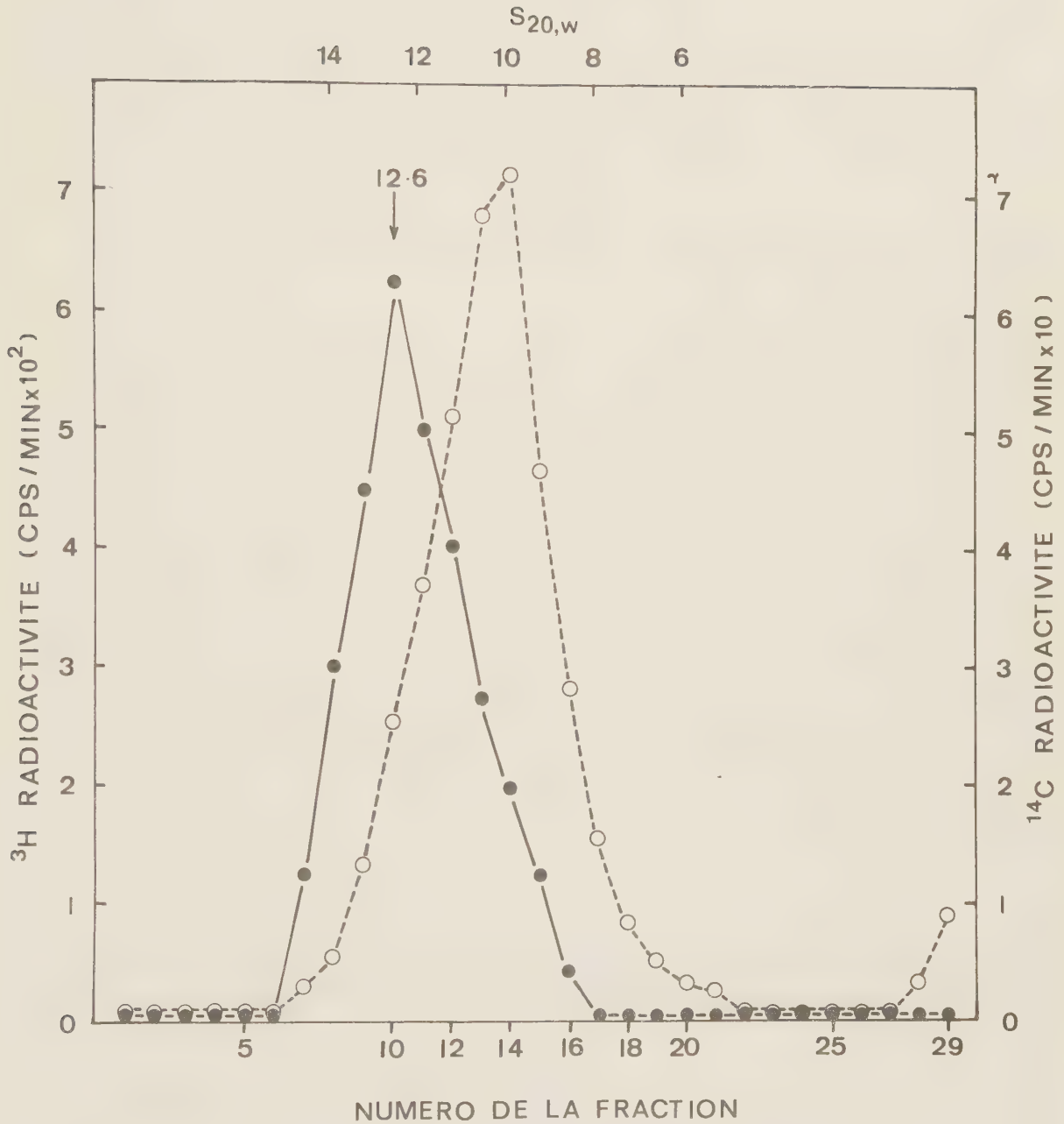


Figure 33 - RESEDIMENTATION DU DNA DU GRADIENT DECRIT DANS LA FIGURE 32.

Les fractions indiquées par un crochet dans la figure 32, sont rassemblées avec des fractions similaires d'un autre gradient effectué dans les mêmes conditions que celui de la figure 32. Le mélange est dialysé toute une nuit pour éliminer le saccharose concentré dans le tube de dialyse, avec du Carbowax 4000 jusqu'à un volume de 0,3 ml, et redialysé pendant 2 heures. La fraction concentrée est sédimentée dans un rotor SW 50,1 pendant 19 heures à 26000 r.p.m. (O) radioactivité ^3H ; (●) radioactivité ^{14}C .

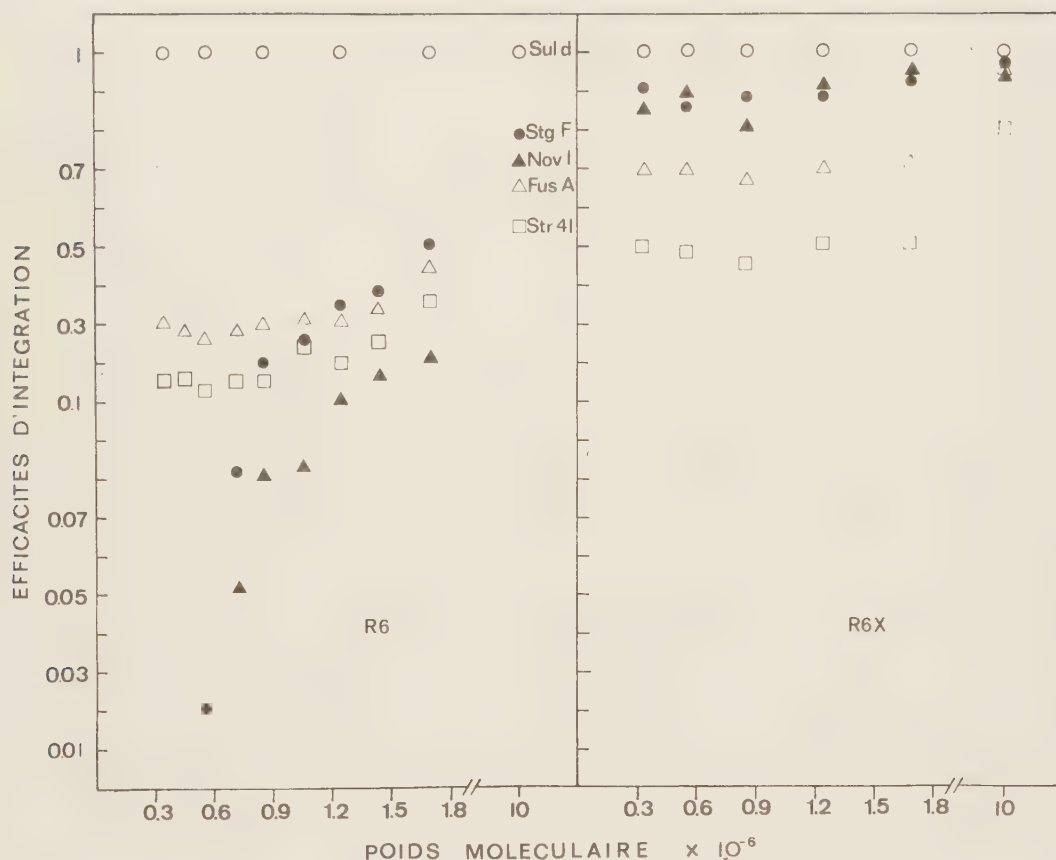


Figure 34 - EFFICACITES D'INTEGRATION MESUREES DANS LES SOUCHES R6 ET R6X DE DIVERS MARQUEURS A PARTIR DES FRACTIONS 10-12-14-16-18 DU GRADIENT DECRIT DANS LA FIGURE 33.

Des volumes égaux des fractions 10-12-14-16-18-sont mélangés avec 1ml de cellules des souches R6 et R6X à leur maximum de compétence. Avec la souche R6, 250 transformées au moins sont comptées pour les marqueurs *sulf-d*, *fus-rA*, et *str-r41* pour chaque fraction. Pour chacun des deux marqueurs LE nous avons compté 150, 165, 90, 5 et 0 colonies à partir des fractions dans l'ordre 10-12-14-16-18. Les données obtenues à partir des fractions 11,13 et 15 sont aussi incluses dans le panneau gauche. Avec la souche R6X, nous avons compté au moins 250 transformées pour chaque marqueur. Dans le cas de la souche R6 les efficacités d'intégration des marqueurs LE sont multipliées par 10.

de la fonction hex puisque cet effet ne se retrouve pas dans la souche non discriminante R6X. Dans une autre expérience de transformation, les efficacités d'intégration des DNA des fractions 11 - 13 - 15 - 17 - de la Figure 33 sont analysées uniquement dans la souche R6. Les résultats montrés dans la Figure 34 (gauche) confirment que les activités des marqueurs *fus-r A* et *str-r 41* baissent jusqu'à une valeur constante alors que les activités des marqueurs LE continuent à chuter et ne sont plus détectables avec le DNA de la fraction 17.

EFFET DE LA FRAGMENTATION DU DNA SUR L'ACTIVITE DE DIVERS MARQUEURS *RIF-R*.

La possibilité d'une corrélation entre la sensibilité à la fragmentation et les efficacités relatives d'intégration est examinée pour un groupe de quatre marqueurs *rif-r*, chacun représentatif d'une des quatre classes d'efficacité. Ces marqueurs possèdent tous le même degré de liaison avec le marqueur *stg-r F* (20 à 40 % de cotransfert) et appartiennent probablement au même locus. Les DNA portant l'une des quatre mutations *rif-r* en plus des marqueurs *nov-r 1* (LE) et *sulf-d* (HE) sont fragmentés jusqu'à un niveau suffisant pour amplifier fortement la différence dans les activités des marqueurs *sulf-d* et *nov-r 1*. La présence des marqueurs LE et VHE, comme contrôle interne fournit un moyen d'estimer l'effet relatif de la fragmentation du DNA sur les activités des 4 marqueurs *rif-r*. Les résultats sont indiqués dans le Tableau 25. Alors que les 4 marqueurs *rif-r* sont inactivés avec environ les mêmes taux dans la souche R6X, ils se comportent différemment dans la souche R6. Les marqueurs *rif-r 32* (VHE) et *rif-r 17* (LE) sont inactivés de la même façon que leur homologue respectif *sulf-d* et *nov-r 1*. Les activités des marqueurs *rif-r 10* et *rif-r 2* montrent des degrés intermédiaires d'inactivation, la diminution d'activité de *rif-r 2* (IE) est plus prononcée que celle de *rif-r 10* (HE). Ainsi il apparaît que la sensibilité relative des marqueurs à la réduction du poids moléculaire du DNA est reliée à leurs efficacités d'intégration, les marqueurs les moins efficaces étant les plus sensibles.

DISCUSSION

L'action de lames tournant à grande vitesse dans une solution de DNA provoque une réduction du poids moléculaire du DNA et une perte importante de son activité biologique (12). Dans les conditions expérimentales permettant d'éviter la formation de molécule de DNA avec des extrémités en simple brin (89), le déclin de l'activité biologique du DNA est presque exclusivement dû à la réduction de la longueur du DNA. Lorsque la transformation est effectuée avec un DNA dont le poids

TABLEAU 25

Inactivation de marqueurs rif-r par fragmentation du DNA transformant

Souche réceptrice	Marqueur	DNA rif-r 32			DNA rif-r 10			DNA rif-r 2			DNA rif-r 17		
		(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
R6	<i>sul-f-d</i>	222	900	25	78	170	46	346	1220	28	350	1200	29
	<i>nov-r1</i>	16,8	16	105	6	2,2	270	23	15	140	24	18,5	130
	<i>rif-r</i>	200	650	30	48	69	70	69,5	76,5	91	26,5	18	150
R6x	<i>sul-f-d</i>	350	1250	23	460	1050	44	296	980	30	295	1130	26
	<i>nov-r1</i>	322	1150	28	480	960	50	295	1090	27	278	1100	25
	<i>rif-r</i>	346	1500	23	450	1070	42	282	775	36	290	1030	28

(1) Nombre de transformées avec le DNA natif/ml $\times 10^4$

(2) Nombre de transformées avec le DNA fragmenté/ml $\times 10^2$

(3) Inactivation de l'activité biologique des marqueurs déterminé par le rapport (1)/(2).

moléculaire est supérieur à 10^7 daltons, la longueur moyenne du fragment de DNA intégré a été estimée à $2 - 3 \times 10^6$ daltons (46). La réduction du poids moléculaire des DNA à partir de cette valeur moyenne entraîne une perte d'activité pour tous les marqueurs mais aussi une amplification des différences entre les activités des divers marqueurs. Par exemple, dans la souche discriminante, les activités des marqueurs LE portés par des DNA de taille définie inférieure à 10^6 daltons sont considérablement réduites par rapport à un marqueur VHE. Il est même possible que les activités des marqueurs LE disparaissent complètement pour une molécule de DNA dont le poids moléculaire est à peine inférieur à 5×10^5 daltons. Pour cet ordre de grandeur les deux marqueurs HE examinés *str-r 41* et *fus-r A*, sont beaucoup moins sensibles que les marqueurs LE, néanmoins ils montrent une sensibilité marquée par rapport au marqueur VHE *sulf-d*. Par comparaison directe des efficacités d'intégration des marqueurs *str-r 41* et *fus-r A* dans les souches discriminantes et non discriminantes, nous pouvons déduire que les activités de ces marqueurs HE portés par des DNA fragmentés correspondent à environ la moitié de celle du marqueur *sulf-d* lorsque la fonction hex est active. Dans la souche *hex⁻*, les divers marqueurs se comportent presque de la même manière quelque soit la taille du DNA utilisé. Le peu de différence observée pour certains marqueurs dans la souche R6X est indépendante de la fonction hex et est vraisemblablement le reflet de différences dans la nature des mutations. Une variation réduite dans les activités de plusieurs marqueurs a aussi été rencontrée par CATO et GUILD (12) dans la transformation de la souche non discriminante RX avec du DNA fragmenté.

Plusieurs marqueurs de résistance à la rifampine, appartenant sans doute au même locus, sont inactivés différemment dans la transformation de la souche *hex⁺* avec du DNA fragmenté mais non fractionné en taille homogène. Là aussi, la sensibilité d'un marqueur donné à la fragmentation du DNA semble dépendre directement de son efficacité d'intégration en plus de la taille de la molécule de DNA donateur.

Pour rendre compte de cette nouvelle propriété des marqueurs dans la souche discriminante, nous proposons ici une version modifiée de l'hypothèse d'EPHRUSSI-TAYLOR (25). La formation d'une région hétéroduplex entre le brin donateur et le brin récepteur est vraisemblablement une étape commune pour tous les marqueurs (40 - 45). A ce stade, une endonucléase reconnaît certains types de bases mal appariées de l'hétérozygote et provoque une incision avec une probabilité identique sur l'un ou l'autre brin (et non préférentiellement sur le brin exogène comme dans le cas de l'hypothèse d'EPHRUSSI-TAYLOR). L'endonucléase qui est active sur un hétérozygote correspondant à une mutation LE, l'est moins pour des mutations IE et HE et complètement inactive pour une mutation VHE. L'intégration complète d'un marqueur VHE est terminée après les interventions séquentielles de nucléases, de polymérases et d'une ligase. Dans le cas d'un hétérozygote LE, l'incision par l'endonucléase spécifique est suivie d'une excision d'une portion de DNA, et d'une

synthèse corrective. Une fois sur deux, le système multienzymatique agit sur le brin donateur entraînant la perte de l'information du marqueur LE et la formation d'un homoduplex. Pour l'autre moitié, les événements de correction se produisent sur le brin récepteur. En même temps que l'excision progresse sur le brin récepteur, les liaisons de covalences s'établissent aux deux extrémités du brin donateur. Suivant la position du marqueur LE sur le fragment inséré du DNA et le temps nécessaire pour établir les liaisons, l'excision peut atteindre une extrémité encore libre du brin donateur et ainsi provoquer une rupture du DNA probablement non réparable. Une bactérie sera transformée pour un marqueur LE uniquement lorsque la longueur du DNA excisé est plus courte que la distance séparant le marqueur LE de l'extrémité du brin donateur correspondant à la polarité de l'excision.

Lorsque cette distance est raccourcie par l'utilisation de DNA dont le poids moléculaire a été réduit par fragmentation, la fréquence des événements aboutissant à une rupture du DNA doit donc augmenter. A la limite, on peut même concevoir qu'une taille critique est atteinte pour laquelle il n'y a plus de transformées LE. Bien que notre estimation sur cette taille critique doive être considérée avec une certaine réserve du fait du faible nombre de colonies comptées, celle-ci pourrait être située autour de 5×10^5 daltons.

Enfin dans un dernier point nous voudrions signaler certaines observations qui laissent supposer que l'établissement des liaisons de covalence entre deux extrémités libres d'un même brin pourrait être une opération plus longue que celle de la fonction hex qui agit en quelques minutes (102). Le traitement par divers agents d'une culture de pneumocoque transformée par du DNA, entraîne une inactivation préférentielle des transformées. La sensibilité des transformées élevée peu après la fixation du DNA, diminue graduellement mais ne devient comparable à celle de l'ensemble de la population qu'après deux générations. Cet effet est observé avec la lumière ultraviolette (66), la mitomycine (4), la nitrosoguanidine (TIRABY, observation non publiée) qui sont des agents induisant des lésions sur le DNA susceptibles d'être réparées et par là même d'exclure une partie de l'information des marqueurs. Cependant, une autre catégorie d'agents, non inducteurs de lésions réparables sur le DNA, présente le même effet : ce sont le chloramphénicol (24), la 8 - azaguanine (1) et le 6 (p-hydroxyphénylazo)-uracile (TIRABY, observation non publiée). Si l'intégrité du DNA récepteur rompue par le DNA inséré était rapidement rétablie, l'on conçoit mal comment cette dernière catégorie de composés inhiberait préférentiellement les transformées.

CHAPITRE IX

ETUDE DE MUTANTS SENSIBLES A L'IRRADIATION ULTRAVIOLETTE

Au cours de la transformation, l'appariement entre le brin d'ADN endogène et le brin exogène peut conduire à des confrontations bases-bases permissives pour les marqueurs à forte efficacité ou non permissives pour les marqueurs à faible efficacité. Selon la théorie d'EPHRUSSI-TAYLOR (25), à laquelle nous avons apporté une modification (Chapitre précédent), un processus de correction procédant par excision puis synthèse réparatrice, interviendrait pour éliminer la mauvaise confrontation. Or, un tel système multienzymatique possédant ces caractéristiques est connu chez les bactéries. C'est le processus de réparation par excision des dimères de pyrimidine provoqués sur le DNA par l'irradiation ultraviolette (53, pour revue).

Afin de déterminer le rôle d'un tel système de réparation dans la correction des mauvais appariements, au cours de la transformation, nous avons entrepris la recherche de mutants qui ne réparent plus les lésions produites par le rayonnement ultraviolet. La plupart des mutants de ce type ont été isolés, chez *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis*, grâce à leur incapacité à pouvoir réparer ces lésions sur le DNA de certains phages. Les premiers phages connus de pneumocoque n'ayant été isolés que récemment (121-122), nous n'avons pu retenir ce type de sélection. Nous avons procédé à une sélection directe de souches sensibles à la lumière ultraviolette par la technique des répliques sur velours à partir d'une culture de pneumocoques traitée par un mutagène. Les propriétés de quelques mutants ainsi isolés sont maintenant présentées.

METHODES

Pour la recherche de mutants sensibles aux U.V., nous avons appliqué successivement trois cribles de plus en plus sélectifs.

Premier type de sélection : Des boîtes mères pour réplique sont préparées à partir d'une culture de Cl₃, traitée à la nitrosoguanidine et diluée de telle façon qu'apparaissent 100 à 150 colonies sur chaque boîte après étalement et incubation. Chacune des boîtes mères est répliquée par la technique du velours, sur trois boîtes contenant du milieu nutritif gélosé. Les deux premières sont irradiées respectivement pendant 10 à 20 secondes (140 et 280 ergs) ; la troisième n'est pas irradiée. Le lendemain, les cellules des colonies absentes sur les boîtes irradiées sont prélevées sur la boîte témoin et cultivées en milieu liquide.

Deuxième type de sélection : La sensibilité aux U.V. de chacun des clones prélevés, est déterminée par une méthode qualitative.

Des cultures des différentes souches à tester sont cultivées dans du milieu peptoné complet jusqu'à une densité optique (DO) de 0,15 à 550 m μ (Spectrophotomètre BECKMAN). Une goutte est prélevée avec une anse de platine puis déposée sur une boîte de Pétri quadrillée sur le fond et contenant 10 ml de milieu de croissance gélosé additionné de sang de Cheval. Une vingtaine de clones peuvent ainsi être ordonnés sur chaque boîte de Pétri. Généralement, 7 boîtes sont préparées puis irradiées 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 secondes respectivement et enfin mises à incuber à 37°C pendant une nuit et à l'obscurité.

Troisième type de sélection : Pour les souches sélectionnées après les deux premiers cribles, on établit, par la méthode quantitative décrite dans le chapitre 1, la courbe de survie à l'irradiation ultraviolette.

RESULTATS

A - PROPRIETES GENERALES DES SOUCHES

Par la technique des répliques, 8 clones sensibles aux U.V. ont été obtenus à partir de trois mutagénèses différentes (souches 362 à 369). La souche 350 a été isolée par la méthode de transformation sur boîte. (Chapitre I)

Sensibilité à l'irradiation ultraviolette et à la mitomycine

Les courbes de survie des différentes souches sensibles aux U.V. sont données dans la figure 35. A l'exception de la souche 364, les plus sensibles aux U.V. sont également les plus sensibles à la mitomycine (Tableau 26).

TABLEAU 26 : *Sensibilité à la mitomycine des souches sensibles aux U.V.*

Souches				
Concentration de	363 - 364	350 - 362		
mitomycine	366 - 368	365 - 367 - 369		Cl ₃
(µg/ml)				
0,05	-	-		-
0,015	-	-		+ -
0,010	-	-		+
0,0075	-	-		+
0,0050	-	+		+
0,0025	+	+		+

La sensibilité à la mitomycine a été déterminée par étalement sur milieu complet additionné des différentes concentrations d'antibiotiques. Les signes + et - indiquant la présence ou l'absence de colonies après une nuit d'incubation.

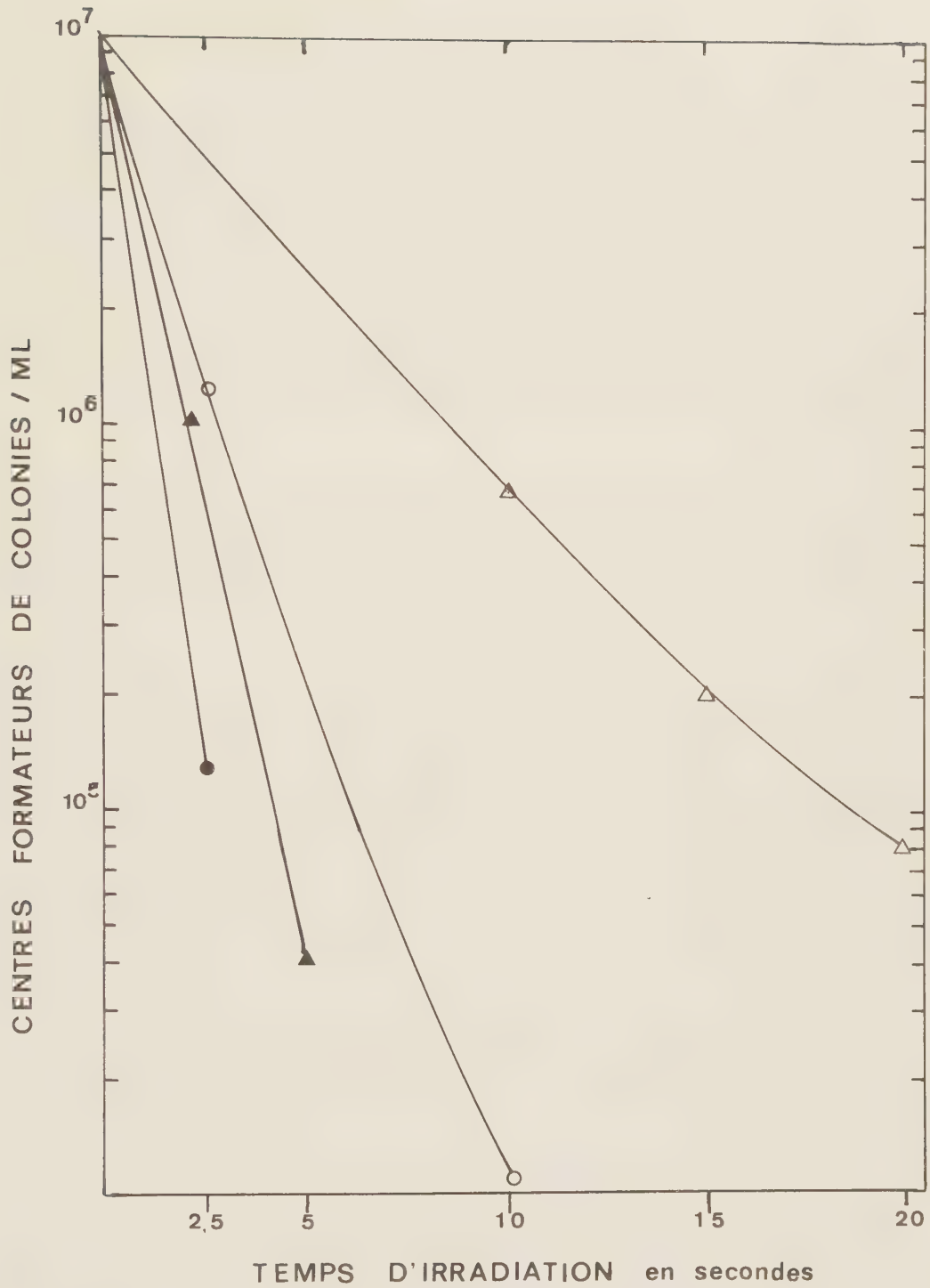


Figure 35 - SENSIBILITE AU RAYONNEMENT ULTRAVIOLET DES SOUCHES 362 à 369
ET DE Cl_3

L'irradiation est effectuée dans le milieu salin. Cl_3 (Δ)
364, 365 ($\circ$); 350, 362, 367, 369 ($\blacktriangle$); 363, 366, 368 ($\bullet$).

Efficacité de transformation des différents marqueurs

Les 9 clones étudiés sont transformables. La valeur moyenne des efficacités des marqueurs de l'ADN 69, obtenue au cours de deux transformations de ces souches, est donnée dans le tableau 27. La faible efficacité de transformation des marqueurs *opt-r2* ou *amiA-r9* n'est modifiée dans aucune de ces souches. Cependant on ne peut établir de corrélation entre cette observation et la sensibilité aux U.V. de ces souches car nous ne connaissons pas la cause de leur sensibilité. Aussi, nous avons essayé de déterminer la nature de la déficience de quelques-uns de ces mutants afin de caractériser, si possible, un mutant déficient pour le processus de réparation par excision.

TABLEAU 27 : Efficacité de transformation des marqueurs *opt-r2*, *amiA-r9*, *ery-r6* dans les souches sensibles aux U.V.

	Souches									
	Cl ₃	350	362	363	364	365	366	367	368	369
<i>opt-r2</i>	0,18	0,25	0,16	0,10	0,19	0,18	0,18	0,22	0,15	0,10
<i>amiA-r9</i>	0,15	0,25	0,15	0,10	0,20	0,10	0,18	0,18	0,25	
<i>ery-r6</i>	0,65	0,80	0,50	0,65	0,70	0,62	0,19	0,56	1	0,80

L'efficacité du marqueur *amiA-r* 9 n'a pas été déterminée dans la souche 369 car cette dernière porte une mutation de résistance à l'aminoptérine.

B - PROPRIETES DE DEUX MUTANTS PURIFIES

Dans nos conditions de mutagénèse, les cellules, traitées à la VTG, ferment vraisemblablement plusieurs mutations, aussi avons-nous, tout d'abord rendu isogénique par transformation, plusieurs mutants qui nous paraissaient être les plus intéressants.

Isogénisation

Les mutations des souches 362 et 369 ont été introduites dans Cl₃ Thy⁻ (60 µg). La sélection des clones sensibles aux U.V., après transformation, est faite selon les mêmes techniques que pour l'isolement de mutants de sensibilité à partir d'une mutagénèse. Les souches purifiées correspondant à 362 d'une part et à 369 d'autre part, sont appelées 402 et 403. Nous nous sommes rendus compte, ensuite, en transformant 402 par l'ADN 403, que l'on n'obtenait pas de bactéries transformées résistantes aux U.V. Les deux souches sont donc mutées dans le même gène. Nous avons donc limité notre étude à la souche 402.

En ce qui concerne la souche 350, très sensible aux U.V., malgré des es-

sais répétés, aucune colonie présentant la même sensibilité n'a pu être isolée. Cependant, une dizaine de clones, moins sensibles que 350 mais tous de sensibilité voisine, ont été obtenus. Une seule souche, appelée 405, a été conservée.

La fréquence élevée de colonies de type 402 ou 405 obtenue lors de la sélection sur réplique après transformation permet de penser que toutes ces souches sont mutées sur un seul gène.

Temps de génération et morphologie des cellules

La souche 403 pousse plus lentement en milieu liquide (Tableau 28). Elle forme des colonies plus petites que celles de la souche sauvage sur milieu solide.

TABLEAU 28 : Temps de génération des cellules de Cl_3 , 402, 405 dans le milieu peptoné complet.

Température	Souches		
	Cl_3 thy ⁻	402	405
37°	30 min	33 min	38 min
30°	55 min	60 min	72 min

Quel que soit le milieu de croissance, les cellules de la souche 405 se présentent sous forme de chaînes de 4 à 8 coques et parfois même plus. La faible proportion des cellules en chaînes pour la souche 402, correspond à celle observée dans la souche sauvage.

Sensibilité à l'irradiation ultraviolette et aux rayons X

La dose d'U.V. correspondant à 37 % de survivants est de 155 ergs pour Cl_3 , 70 ergs pour 405 et 10 ergs pour 402 (figure 36). La caféine, qui est un inhibiteur de l'excision des dimères de pyrimidine (42-101), ne modifie pas la sensibilité de la souche 402 alors que la sensibilité des deux autres souches augmente. La fréquence de cellules en chaîne dans la culture de la souche sauvage après irradiation par les U.V., s'élève, dans le milieu peptoné, d'un facteur 2 à 3. Dans les cultures irradiées de 402 et 405, le nombre de cellules en chaîne n'est pas significativement plus élevé.

La sensibilité aux rayons X de la souche 402 est très peu différente de celle de la souche sauvage. La sensibilité de 405 est plus prononcée. (figure 37).

Inactivation du DNA in vitro par l'irradiation ultraviolette

De nombreuses études ont été faites sur l'action de la lumière

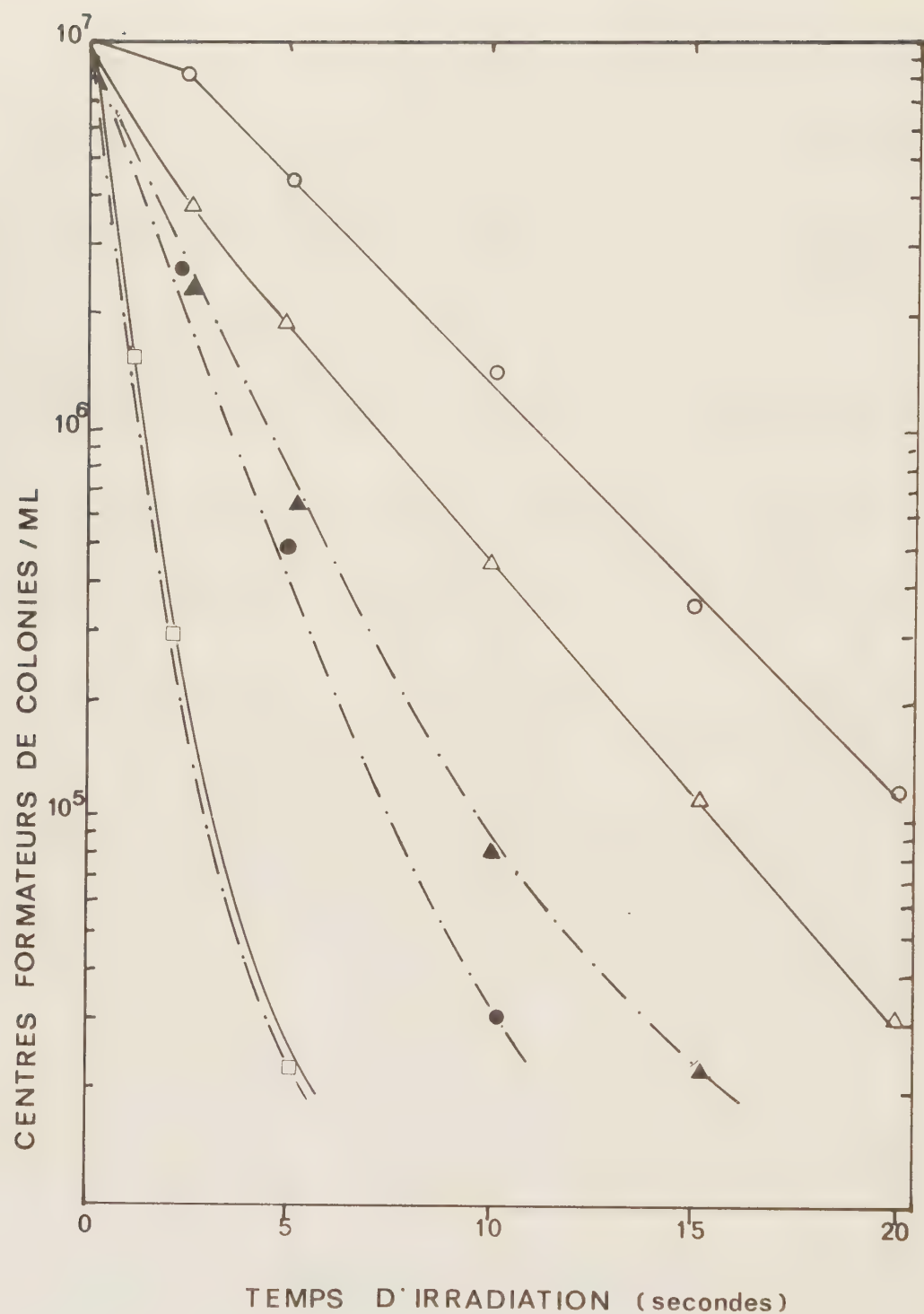


Figure 36 - SENSIBILITE AU RAYONNEMENT ULTRAVIOLET DE Cl₃, 405, 402.

L'irradiation est effectuée dans le milieu de transformation (CSA) sans albumine. La caféine est ajoutée après irradiation dans le milieu gélosé à la concentration finale de 1mg/ml.

Cl₃ (O); 405 (Δ); 402 (□). Symboles ouverts sans caféine, symboles fermés avec caféine.

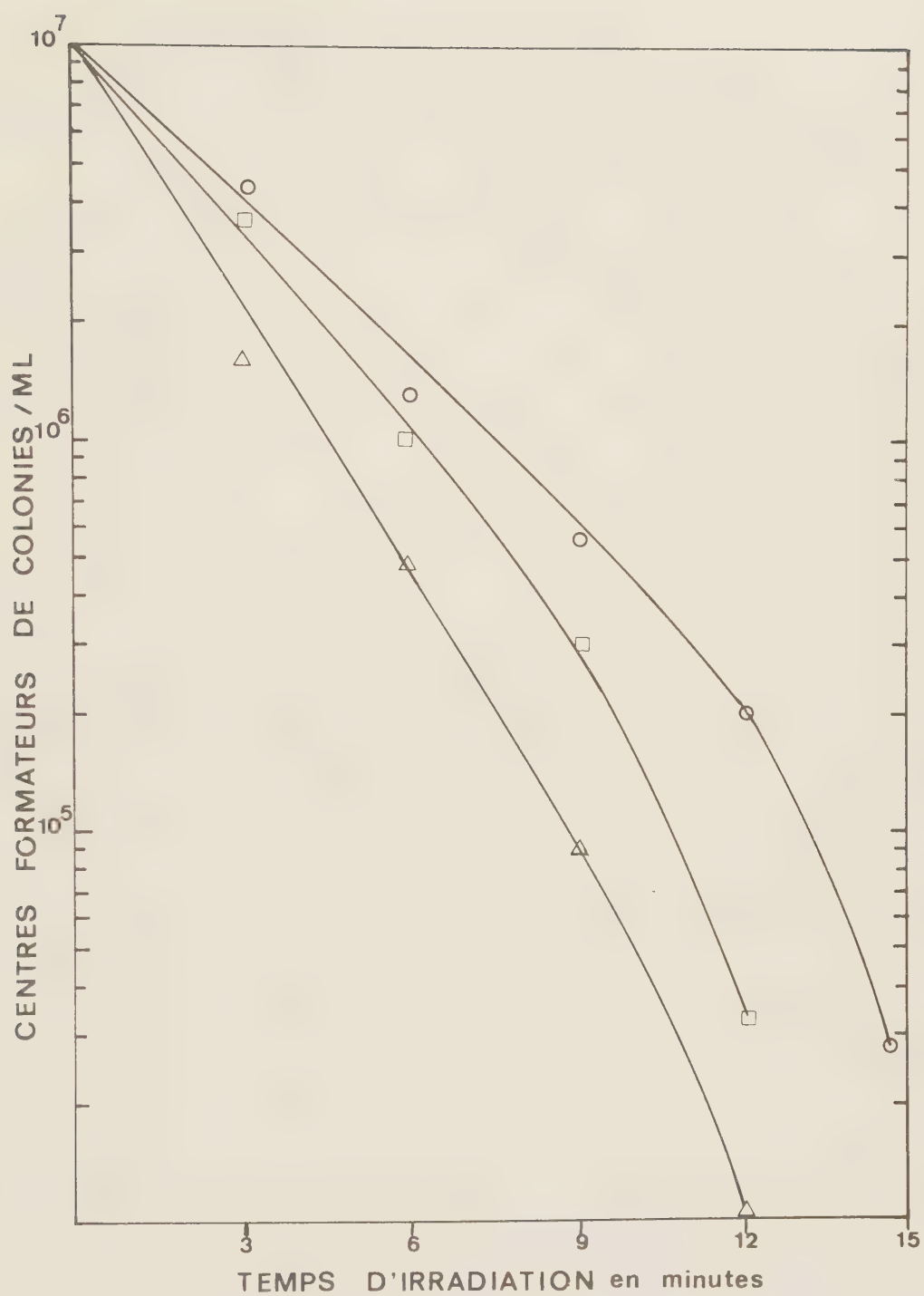


Figure 37 - SENSIBILITE AUX RAYONS X DE Cl₃, 405, 402.
Cl₃ (O); 402 (□); 405 (△).

ultraviolette sur le DNA transformant du pneumocoque. Le fait le plus intéressant qui en ressort est la sensibilité plus grande des marqueurs LE par comparaison aux marqueurs HE (26-57-112 et Chapitre II). Nous avons refait ces expériences en utilisant 402 et 405 comme souches réceptrices.

Nous voyons dans la figure 38 que les courbes d'inactivation des marqueurs *opt-r2* et *str-r41* sont complexes dans les deux souches mutantes. Par comparaison avec Cl₃, le marqueur HE est plus résistant dans 402 jusqu'à environ 1800 ergs, puis au-delà, devient plus sensible. La pente d'inactivation pour le marqueur LE est identique à celle trouvée dans la souche sauvage. Les deux types de marqueurs augmentent de sensibilité lorsque la souche 405 est prise comme réceptrice. Un résultat analogue a été obtenu avec le mutant de recombinaison A5-5-9A isolé par VOVIS et BUTTIN (129) (TIRABY, résultats non montrés)

De cette étude sur l'inactivation du DNA, nous retiendrons que les gènes des mutants 402 et 405 participent d'une façon ou d'une autre, à la restauration de l'activité du DNA traité aux U.V.

Efficacité de transformation des différents marqueurs

Les souches 402 et 405 ne modifient pas les efficacités des marqueurs LE (Tableau 29). Cependant, les efficacités des deux marqueurs liés de résistance à l'erythromycine sont plus élevées dans 402 que dans Cl₃.

TABLEAU 29 : *Efficacités d'intégration des marqueurs portés par le DNA de la souche 39 mesurées dans différentes souches réceptrices.*

Souches	Marqueurs				<i>ery-r2,6/</i>
	<i>str-r41</i>	<i>opt-r2</i>	<i>ery-r2</i>	<i>ery-r6</i>	<i>ery-r6</i>
Cl ₃	1	0,20	0,27	0,38	0,35
402	1	0,19	0,68	0,82	0,55
405	1	0,13	0,36	0,41	0,25

Les souches 402 et 405 exigeant la thymidine pour leur croissance sont résistantes à l'aminoptérine. De ce fait, les transformées *ami-r* n'ont pas été sélectionnées.

Le degré de liaison entre les marqueurs *ery-r2* et *ery-r6* semble différent selon la souche. Mais cette différence n'est probablement pas significative puisque RAVIN et IYER (94) ont trouvé des variations de cet ordre au cours de la transformation de leur souche standard par ces deux mêmes marqueurs.

Mesure de l'incorporation de l'ADN radioactif

La quantité de DNA marqué par la thymidine tritiée (activité spécifique:

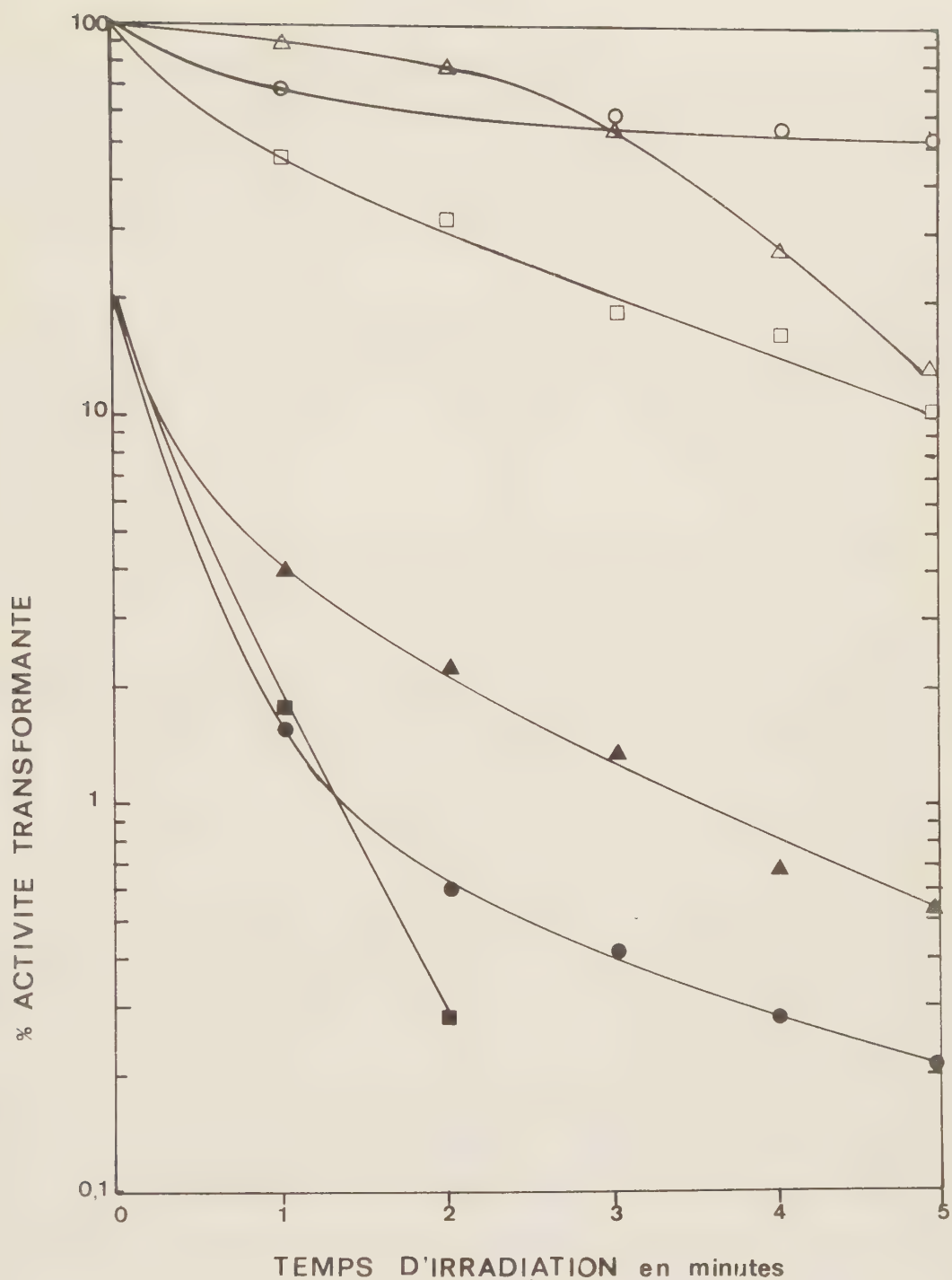


Figure 38 - INACTIVATION DES MARQUEURS *str-r41* ET *opt-r2* PAR LE RAYONNEMENT ULTRAVIOLET SUR LE DNA 69 IN VITRO.

Les cinétiques d'inactivation sont mesurées dans les souches *Cl3* (O); 402 (Δ) et 405 ($\square$).
Symboles ouverts *str-r41*, symboles fermés *opt-r2*.

4.10^5 coups/mn/ μ g) qui a pénétré dans les cellules, est déterminée par la méthode décrite dans le chapitre I. L'efficacité relative de transformation de la souche 402 est aussi bonne, sinon meilleure, que celle de la souche sauvage. Par contre, dans la souche 405, l'incorporation du DNA radioactif est environ cinq fois moins élevée que dans Cl_3 (Tableau 30). Un résultat similaire a été obtenu par VOVIS et BUTTIN avec la souche A5-5-9A (129).

TABLEAU 30 : Incorporation du DNA radioactif dans les souches Cl_3 , 402 et 405.

Souches	Nombre de transformées <i>str-r/ml</i> (1)	Coup/mn/ ml de cul- ture (2)	<i>str-r41</i> coups (3)	Efficacité de transforma- tion
Cl_3	$2,43.10^6$	10 372	230	1,00
402	$1,85.10^6$	6 346	290	1,26
405	$2,1.10^5$	4 950	42	0,18

L'efficacité relative de transformation est définie par le rapport :
(3) / (3) Cl_3 .

DISCUSSION

Aucun des 9 mutants sensibles à l'irradiation ultraviolette et capables de donner des transformées ne modifie les efficacités des marqueurs. Nous avons étudié en détail deux de ces mutants rendus au préalable isogéniques, afin de caractériser la nature de leur déficience.

La souche 405 présente les propriétés caractéristiques d'un mutant de recombinaison : mauvaise croissance, sensibilité aux U.V. et aux rayons X et diminution identique de l'efficacité de transformation pour tous les marqueurs. Ces propriétés sont analogues à celles décrites par VOVIS et BUTTIN (129) pour le mutant de recombinaison de *Diplococcus pneumoniae* A5-5-9A dans lequel l'activité d'une nucléase A.T.P. dépendante est très réduite. Cependant, la mesure de cette activité enzymatique n'a pas été faite dans la souche 405.

La souche 402, dont la sensibilité aux U.V. est identique à celle du mutant d'origine 302 n'est que légèrement sensible aux rayons X. L'efficacité relative de transformation est normale dans cette souche. Après irradiation, les cellules de 402 ne forment pas de longues chaînes, de plus, la caféine, contrairement aux souches 405 et Cl_3 , n'augmente pas la sensibilité des cellules irradiées. Cette substance inhibe l'excision des dimères de pyrimidine chez *Eschérichia coli*. Les propriétés de 402 sont donc similaires à celles des mutants d'*Eschérichia coli*

UVR A, UVR B, UVR C, déficients pour les étapes précoces du système de réparation par excision. Cependant, on n'a pas encore vérifié expérimentalement si les cellules de cette souche peuvent ou non exciser les dimères de pyrimidine.

S'il s'avère que la souche 402 est bien incapable d'exciser les dimères de pyrimidine, l'absence d'effet dans cette souche sur les efficacités des marqueurs implique soit que l'hypothèse proposée par EPHRUSSI-TAYLOR est inexacte, soit que le système de réparation des dimères est différent du système de correction. Dans ce dernier cas, on peut aussi imaginer que seules, certaines étapes soient différentes dans les processus. Les étapes enzymatiques qui interviennent dans la réparation par excision des lésions U.V. ont été décrites de la façon suivante (CLEAVER) (16) :

- Reconnaissance de la lésion, intervention d'une endonucléase qui rompt un brin du DNA à proximité du dimère et laisse une extrémité terminée par un groupement phosphoryle et l'autre par un groupement hydroxyle.

— Le groupement phosphoryle est enlevé par une phosphomonoestérase, la région comportant le dimère est éliminée par une exonucléase.

- La brèche est remplie par une polymérase qui prend le brin complémentaire comme matrice.

- La dernière liaison nécessaire à l'intégrité de la chaîne est effectuée par une ligase.

On pourrait supposer que les enzymes qui interviennent dans les étapes précoces comme la reconnaissance ou l'incision, sont différentes dans le système de correction imaginé par EPHRUSSI-TAYLOR et le système de réparation par excision. C'est ainsi que, par exemple chez *Micrococcus lysodeikticus* existe une première endonucléase spécifique des lésions provoquées sur le DNA par le méthane sulfonate de méthyle et une deuxième spécifique des lésions provoquées par les U.V. (82). Le système de correction pourrait donc se différencier du processus de réparation par excision, par l'existence d'enzymes différentes dans les premières étapes de ce processus multienzymatique. De ce fait, les souches non discriminantes qui pourraient être déficientes pour une endonucléase spécifique de certaines paires de bases mal appariées possèderaient, comme cela a été démontré dans les chapitres II et IV, une sensibilité normale aux U.V.

L'irradiation du DNA transformant par la lumière ultraviolette entraîne une baisse de son activité biologique. Nous avons vu que dans les souches discriminantes, la diminution de l'activité des marqueurs génétiques est fonction de leurs efficacités individuelles d'intégration et de la dose d'U.V. (26-57-112). Les comportements des souches 402, 405 et A5-5-9A vis à vis du DNA transformant irradié par les U.V. indiquent que probablement les mécanismes d'excision et synthèse, et

de recombinaison, participent d'une manière ou d'une autre à la réparation des lésions U.V. du DNA transformant. Tout modèle destiné à expliquer l'hypersensibilité des marqueurs LE aux U.V. devra donc tenir compte de ce fait.

4ième PARTIE

ETUDE ENZYMATIQUE PRELIMINAIRE DU PROCESSUS DE DISCRIMINATION

CHAPITRE X

ESSAI DE CARACTERISATION D'UNE ACTIVITE ENZYMATIQUE IMPLIQUEE

DANS LE PROCESSUS DE DISCRIMINATION *

Nous avons vu dans les chapitres précédents que l'existence de plusieurs classes d'efficacité pour les mutations ponctuelles s'expliquait par la présence d'un système enzymatique capable de reconnaître et d'éliminer une séquence de DNA renfermant certaines paires de bases mal appariées. Cette reconnaissance pourrait être le fait d'une endonucléase spécifique dont nous avons entrepris la mise en évidence. Pour cela nous avons essayé de caractériser une activité enzymatique qui serait présente dans la souche discriminante R6 mais serait absente dans la souche non discriminante R6X. Afin de nous replacer dans des conditions proches de celles rencontrées in vivo nous avons choisi d'utiliser comme substrat de l'activité nucléasique, un DNA hétéroduplex composé d'un brin portant les allèles mutées pour des marqueurs HE et LE de résistance aux antibiotiques et d'un brin portant les allèles sauvages. Nous avons recherché une diminution sélective des activités biologiques des marqueurs LE, consécutive au traitement du DNA hétéroduplex par les extraits bruts des souches hex⁺.

D'après la théorie que nous avons exposée dans le chapitre VIII le processus de discrimination agirait par scission d'un seul des brins de l'hétérozygote LE. Dans ce cas, on peut supposer que l'action de l'endonucléase sur un hétérozygote de type LE porté par un DNA hétéroduplex n'entraînera que 50 % de perte d'activité de ce marqueur LE par rapport à l'activité d'un hétérozygote non touché par l'enzyme. Aussi, afin d'amplifier cet effet, nous comparerons le nombre de transformées pour deux marqueurs LE liés au nombre de transformées pour deux marqueurs HE également liés. Le seul cas connu chez le pneumocoque de deux marqueurs liés de phénotypes différents ne pouvant être utilisé par manque d'une sélection facile pour l'un des phénotypes, nous avons dû rechercher de nouveaux groupes de liaisons. La découverte de la liaison entre les marqueurs de résistance à la rifampine et ceux de résistance

* Pour la réalisation du travail présenté dans ce chapitre nous avons bénéficié des fructueux conseils de Ian MOLINEUX et de Malcolm GEFTER.

à la streptolydigue d'une part et entre les marqueurs de résistance à la streptomycine et ceux de résistance à l'acide fusidique d'autre part nous a permis de construire une souche multi-marquée répondant à cette exigence. Cette souche appelée 119 a déjà été utilisée plusieurs fois au cours de diverses expériences présentées dans cet exposé. Les deux marqueurs LE liés, *stg-r^F* et *rif-r 23* (25 % de co-transfert) sont indépendants des deux marqueurs HE liés, *str-r 41* et *fus-r A* (30 % de cotransfert).

MATERIELS ET METHODES

Préparation des DNA hétéroduplex : Le DNA extrait de la souche 119 à la concentration de 50 µg/ml dans NaCl 0,003 M-citrate de sodium 0,003 M, est mélangé à 5 ou 10 volumes de DNA de la souche R6 *str-r 41*, *fus-r A* (50 µg/ml). Ce mélange de DNA (1 ml) est dénaturé par Na OH 1 M (0,1 ml) pendant 20 minutes à la température ambiante. Puis le pH est ajusté à 7 par K H₂ PO₄ à 12 % (0,3 ml). La renaturation du DNA est réalisée en incubant 1 volume de DNA dénaturé avec 1 volume de la solution suivante : formamide pur (0,8 ml), K₂ H PO₄ à 13 % (0,15 ml), K H₂ PO₄ à 12 % (0,05 ml), Tris 0,1 M et EDTA 0,01 M pH8 (0,05 ml) pendant une nuit à 37°. La réaction est arrêtée en diluant au dixième dans NaCl 0,0015 M, citrate de sodium 0,00015 M. Cette solution de DNA (2,5 µg/ml) dont la concentration en agent chélateur d'ions a été réduite est utilisée pour les essais enzymatiques. Le pourcentage de renaturation mesuré par l'activité biologique du DNA est environ de 80 % par rapport à celle du mélange avant dénaturation.

Isolement de souches discriminantes et non discriminantes déficientes pour une ou deux désoxyribonucléases : Le pneumocoque possède deux désoxyribonucléases majeures, l'une une endonucléase, l'autre une exonucléase, particulièrement gênantes pour notre essai enzymatique. De nombreux mutants déficients pour l'endonucléase A et l'exonucléase A ont été isolés par LACKS (59) qui nous a gracieusement fourni la souche R6 *endo⁻²*, *exo⁻¹*. Nous avons introduit par transformation les mutations *endo⁻²* et *exo⁻¹* séparément ou ensemble dans nos souches R6 et R6X. La méthode de LACKS (59) sensiblement modifiée a été retenue pour sélectionner et caractériser les transformées pour ces deux marqueurs. Cette méthode est basée sur le changement de couleur du vert de méthyle qui fixé sur le DNA donne une coloration verte, stable à pH 7,5, mais qui devient incolore à ce pH après dégradation enzymatique du DNA. Les boîtes de Pétri sont préparées de la façon suivante : une première couche de 10 ml de milieu M et de 0,25 ml de sang est d'abord coulée, puis après le durcissement du milieu une deuxième couche est versée sur la première. La deuxième couche

est constituée de 1,5 ml de vert de méthyle (solution à 1 mg/ml dans un tampon acétate d'ammonium pH 4,3, extraite 3 fois par le chloroforme et stérilisée par ébullition pendant 10 minutes), 1,25 ml de DNA (solution à 2 mg/ml de DNA de spermes de saumon, Calbiochem, stérilisé par précipitation à l'alcool), 5 ml de milieu M, 0,1 ml de la dilution appropriée des cellules et d'acétate de magnésium ($2 \times 10^{-3} M$).

Les boîtes sont incubées pendant 40 heures à 30° et 24 heures à 37°. Les cellules de génotype *endo*⁺ *exo*⁺ forment un très large halo incolore autour de la colonie, alors qu'aucun halo n'est visible autour des colonies des cellules *endo*⁻ *exo*⁻. Les cellules *endo*⁻ *exo*⁺ présentent un très petit mais distinct halo, les colonies de cellules *endo*⁺ *exo*⁻ sont, elles, entourées par un halo légèrement supérieur.

Les souches suivantes : R6 *endo*⁻ *exo*⁻ (600) R6 *endo*⁻ *exo*⁺ (610), R6X *endo*⁻ *exo*⁻ (700) et R6X *endo*⁻ *exo*⁺ (710) seront utilisées dans les expériences présentées dans ce chapitre.

Préparation des extraits acellulaires : Les cellules des souches mentionnées ci-dessus sont mises à pousser dans le milieu M1 constitué de 10 g de tryptique (BBL), 5 g néopeptone (Difco), 1 g yeast extract (Difco), 2,5 g brain heart infusion (Difco), 5 g NaCl, 1,25g Trizma base (Sigma) pour 1 litre d'eau distillée. Ce milieu est stérilisé par autoclavage ; du glucose (0,2 %) et du saccharose (0,2 %) sont ajoutés avant son utilisation. Le pH des cultures est maintenu dans des limites comprises entre 7 et 8 par l'addition de soude dès le virement au jaune du rouge de phénol ajouté aux cultures. Après cinq ajustements de pH, les cellules sont centrifugées, lavées deux fois dans le tampon de lyse (Tris 20 m M pH 80 acétate de magnésium 0,1 m M, EDTA 0,2 m M, dithiothreitol, DTT, 1 m M,) et sont congelées à - 70°. Environ quatre grammes de cellules sont obtenus pour 1 litre de culture.

Avant leur utilisation les cellules sont dégelées lentement à 4° et sont remises en suspension dans le tampon de lyse contenant en outre 0,05 % de Triton X 100 (1g de cellules dans 1 ml de tampon). On congèle à nouveau la suspension cellulaire pendant 1 minute avec le mélange carboglace-alcool puis on la dégèle rapidement à 37° (5 minutes). On répète cette opération une nouvelle fois et on centrifuge le lysat cellulaire à 15000 rpm pendant 20 minutes. Le surnageant contient beaucoup de DNA qui interfère avec la détermination biologique de l'activité du DNA hétéroduplex. Aussi nous éliminerons le DNA soit par la méthode de partition de phase décrite par ALBERT et HERRICK (2), utilisant le polyéthylène glycol et le sulfate de dextrane, soit par séparation sur colonne de DEAE cellulose à concentration ionique élevée (100). Après dialyse pendant une nuit à 4° contre le tampon de lyse pour réduire les concentrations en sel, ces extraits sont utilisés pour les réactions enzymatiques.

Nature de l'essai enzymatique : Le milieu réactionnel (0,6 ml) contient :

Tris acétate 50 m M pH 8,0; acétate de Mg 1 m M ; EDTA 0,1 m M ; DTT 1 m M ; gélatine 0,01 % ; DNA hétéroduplex 0,2 µg ; extrait acellulaire 50 µl. Le milieu est incubé à 37° et à des temps variables on prélève un échantillon de 100 µl. La réaction est arrêtée par chauffage à 60° pendant 15 minutes.

Chaque échantillon est mélangé à une fraction aliquote de 1 ml de cellules compétentes dégelées et après 2 heures d'expression de phénotype en liquide on détermine le nombre de double transformées *str-r*, *fus-r* et *stq-r*, *rif-r*.

RESULTATS

ACTION DE LA DESOXYRIBONUCLEASE PANCREATIQUE SUR L'ACTIVITE DU DNA HETERODUPLEX

Avant d'utiliser le DNA hétéroduplex comme substrat pour la recherche d'activités nucléasiques spécifiques des hétérozygotes LE, il était indispensable de connaître l'effet de nucléase non spécifique sur l'activité de ce DNA. Nous avons exposé le DNA 119 natif et le DNA 119 hétéroduplex avec le DNA de la souche R6X *str-r* 41, *fus-r* A à la désoxyribonucléase pancréatique. Les cinétiques d'inactivation des paires de marqueurs *stq-rif* et *str-fus* sont indiquées dans la figure 39. La diminution de l'activité des DNA semble être plus importante dans le cas du DNA hétéroduplex. Par ailleurs, le rapport du nombre de transformées *str-r*, *fus-r* sur le nombre de transformées *stq-r*, *rif-r* augmente progressivement avec la perte d'activité des DNA et cela de façon identique avec le DNA natif et le DNA hétéroduplex. Cette légère différence dans la sensibilité des deux paires de marqueurs devra être considérée pour toutes les expériences dans lesquelles nous rechercherons une inactivation préférentielle de la paire de marqueurs LE-LE.

ACTION DES EXTRAITS ACELLULAIRES DE DIVERSES SOUCHES SUR L'ACTIVITE DU DNA HETERODUPLEX.

Les extraits acellulaires de la souche R6 dégradent très rapidement tout DNA transformant. Dans nos conditions expérimentales, 99 % de l'activité du DNA hétéroduplex est perdue après 30 minutes de réaction. Cette perte de l'activité biologique des DNA est due aux deux nucléases prédominantes chez le pneumocoque comme l'indiquent les résultats de l'action des extraits provenant de souches déficientes pour une ou les deux nucléases (tableau 31). Les extraits des double mutants

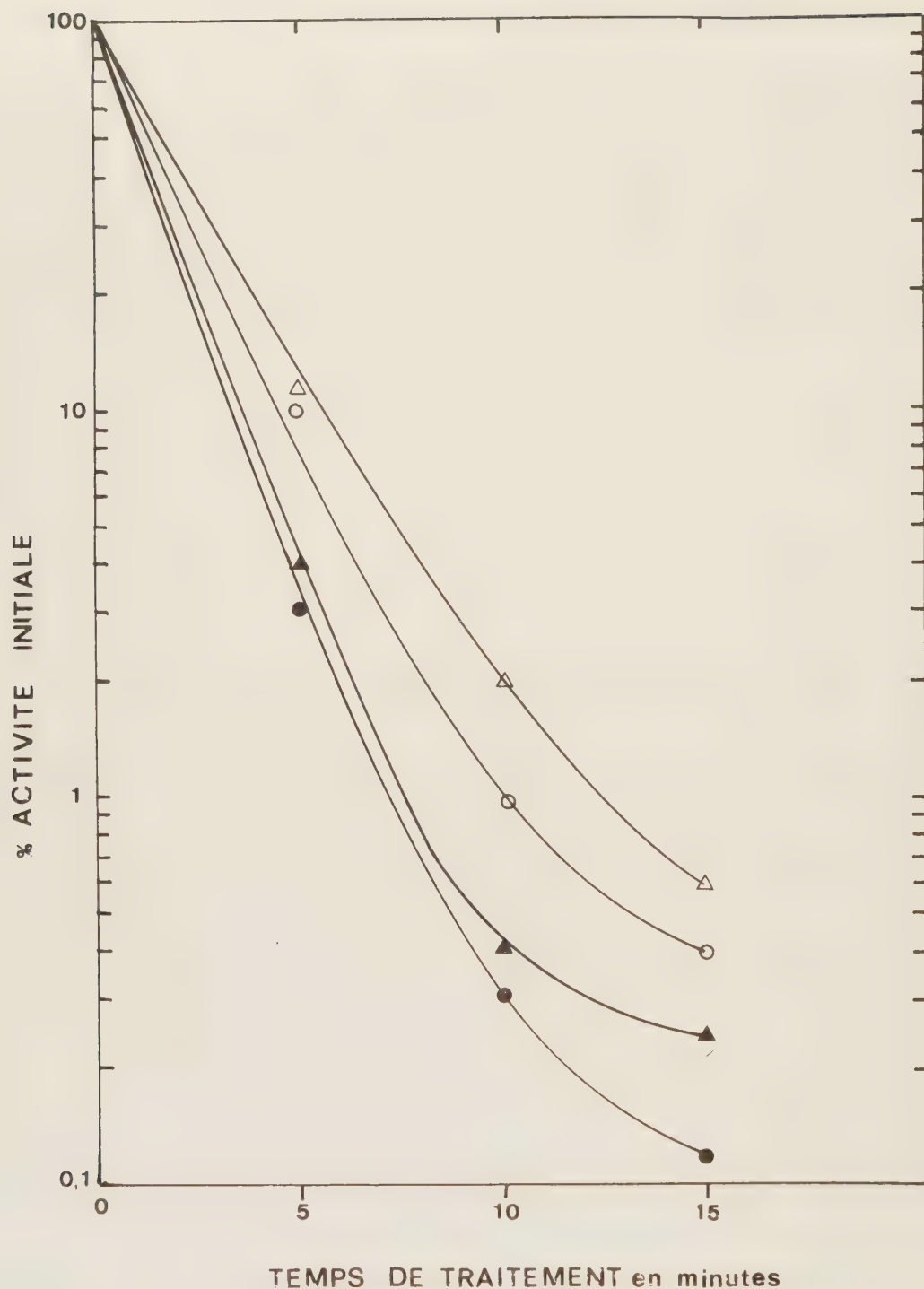


Figure 39 - INACTIVATION DES PAIRES DE MARQUEURS *str-r41*, *fus-rA* ET *rif-r23*, *stg-rF* PAR LA DESOXYRIBONUCLEASE PANCREATIQUE.

Le DNA natif de la souche 119 et le DNA hybride 119/*str-fus* sont exposés à 10^{-2} $\mu\text{g/ml}$ de DNase pancréatique. L'activité biologique des deux DNA est mesurée dans la souche R6X.

Symboles ouverts: DNA natif; symboles fermés: DNA hybride; triangles : *str-r*, *fus-r*; cercles: *stg-r*, *rif-r*.

TABLEAU 31

Inactivation d'un DNA hybride par des extraits acellulaires de diverses souches de pneumocoque

Souches	Génotypes	Durée de l'essai enzymatique					
		0h		3 h		6 h	
		(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
R6	$her^+, endo^+, exo^+$	100	17	<0,1	-	<0,1	-
600	$her^+, endo^-, exo^-$	100	21	100	35	90	40
610	$her^+, endo^-, exo^+$	100	18	48	76	41	182
700	$her^-, endo^-, exo^-$	100	18	80	30	49	26
710	$her^-, endo^-, exo^+$	100	21	40	29	42	45

(1) Pourcentage de l'activité résiduelle par rapport à l'activité initiale de la paire de marqueurs $str-r$ 41, $fus-r$ A.

(2) Rapport du nombre de double transformées $str\text{-}x$, $jus\text{-}x$ sur le nombre de double transformées $stq\text{-}x$, $irif\text{-}x$. Les expériences dont les résultats sont indiqués dans ce tableau ont été effectuées le même jour, à la seule exception de la souche R6.

endo⁻ *exo*⁻ de phénotype *hex*⁺ ou *hex*⁻ sont très peu actifs sur le DNA hétéroduplex. Notons cependant que l'absence d'activité nucléasique dans l'extrait brut de ces souches n'est qu'apparente puisque au cours de la purification sur colonnes de DEAE et de phosphocellulose plusieurs activités nucléasiques apparaissent.

Les extraits de la souche 600 de phénotype *hex*⁺ semble affecter le rapport *str-fus/stg-rif* plus fortement que ne le font les extraits de la souche 700 de phénotype *hex*⁻ (tableau 31). Mais cet effet différentiel nécessite un temps très long de réaction pour devenir significatif. Aussi nous avons essayé de faire varier les conditions de l'essai enzymatique afin d'augmenter la vitesse de réaction. Nous n'avons pas réussi dans cette entreprise malgré les centaines d'essais réalisés dans lesquels nous faisions varier chaque fois un ou plusieurs paramètres. Il nous faut également signaler que les résultats favorables d'un jour étaient le plus souvent non reproductibles les jours suivants. Notre tentative de détection d'une activité enzymatique présente dans la souche 600 mais absente dans la souche 700 s'est donc soldée par un échec. Cependant nous avons obtenu des résultats beaucoup plus prometteurs avec deux autres souches, utilisées tout à fait accidentellement pour cette étude. Par comparaison des résultats obtenus avec les souches 610 et 710 on peut constater un effet important des extraits de la souche 610 sur le rapport *str-fus/stg-rif* (tableau 31). Après 3 heures de réaction l'augmentation de ce rapport avec la souche 610 est pratiquement la même que pour des durées de 20 heures avec la souche 600 alors que ce même rapport augmente très peu et de façon identique avec les souches 700 et 710 de phénotype *hex*⁻. Tout se passe comme si la présence de l'exonucléase dans les extraits bruts amplifiait l'effet visible sur la paire de marqueurs LE liés, d'une activité présente dans les souches *hex*⁺ mais absente dans les souches *hex*⁻.

DISCUSSION

Les extraits acellulaires de la souche R6 *endo*⁻ *exo*⁻ (*hex*⁺) dégradent, semble-t-il, plus sélectivement la paire de marqueurs LE liés *stg-r*, *rif-r* que la paire de marqueurs HE liés *str-r*, *fus-r*, que ne le font les extraits de la souche R6X *endo*⁻ *exo*⁻ (*hex*⁻) ou la désoxyribonucléase pancréatique. Cependant les temps de réaction doivent être très longs pour obtenir un effet significatif. Même dans les meilleures conditions et pendant une nuit d'incubation, l'augmentation du rapport HE-HE/LE-LE s'avère insuffisante pour entreprendre la purification de l'activité enzymatique. Toutes nos tentatives pour augmenter la vitesse de réaction avec les

extraits de la souche 600 ont été infructueuses jusqu'à présent. Par contre, les extraits de la souche R6 *endo*⁻ *exo*⁺ (610) semblent dégrader plus rapidement et plus sélectivement les hétéroduplex LE-LE que les homoduplex HE-HE que ne le font les extraits de toutes les autres souches.

Ces résultats impliquent que l'exonucléase a un effet amplificateur sur l'action des enzymes spécifiques des hétéroduplex LE. Une hypothèse plausible est que l'exonucléase agirait à partir de l'incision provoquée par l'endonucléase spécifique des hétéroduplex LE, soustrayant ainsi la cassure à l'action réparatrice des ligases. Notons cependant que le nicotinamide mononucléotide (NMN), inhibiteur des ligases bactériennes de *E. Coli* et de *B. Subtilis* n'a aucun effet sur la vitesse de réaction des extraits de la souche 600.

L'augmentation très importante du rapport HE-HE/LE-LE dans le cas de la souche 610 rend possible une tentative de purification de l'activité, à condition d'ajouter l'exonucléase du pneumocoque purifiée ou non à tous les essais enzymatiques.

Cette possibilité nous amène à proposer un autre substrat qui après la réaction enzymatique pourra être analysé par les méthodes conventionnelles de mesure de radioactivité. Nous avons vu dans le chapitre V que le DNA des souches hétérologues de pneumocoque saturait la fonction hex des cellules réceptrices. Les brins complémentaires de 2 DNA hétérologues provoquent au cours de leur appariement un grand nombre de bases mal appariées reconnues par le système enzymatique hex. Le substrat et l'essai enzymatique auxquels nous pensons sont donc les suivants : le DNA de la souche 119 marqué par des isotopes radioactifs est hybridé avec un DNA de souches hétérologues de pneumocoque non marqué. Ce DNA hétéroduplex est éventuellement traité par la nucléase S1 d'*Aspergillus oryzae*, disponible commercialement, spécifique des DNA en simple brin, afin d'éliminer les parties non hybridées. Ce DNA après les réactions par les différents extraits est soumis à l'action de la phosphatase alcaline si le DNA est marqué au P³² ou à l'exonucléase du pneumocoque si le DNA est marqué au tritium. Par rapport au DNA contrôle constitué par le DNA de la souche 119 hybridé avec lui-même, le DNA hétéroduplex doit contenir de nombreux hétérozygotes de type LE et donc être soumis à l'action des endonucléases spécifiques de ces hétérozygotes. La mesure de la radioactivité dans la fraction soluble à l'acide trichloroacétique, libérée par l'action ultérieure d'enzymes agissant à chaque cassure, comme la phosphatase alcaline ou l'exonucléase de pneumocoque devrait permettre de détecter l'activité recherchée. Le double avantage de cette méthode sur l'essai biologique est d'être rapide et de permettre l'analyse simultanée d'un plus grand nombre d'extraits ou de fractions.

Cette recherche est actuellement en cours et développée dans le sens que nous venons d'indiquer.

5ième PARTIE

DISCRIMINATION DES MARQUEURS CHEZ

LES PRINCIPALES ESPECES BACTERIENNES TRANSFORMABLES

CHAPITRE XI

DISCRIMINATION DES MARQUEURS CHEZ LE STREPTOCOQUE

Tout au long de cet exposé nous avons implicitement admis que l'effet marqueur observé au cours de la transformation était une caractéristique propre au pneumocoque. Ce point de vue a été établi à la suite de recherches bibliographiques et expérimentales. Dans la littérature consacrée à *Bacillus subtilis*, l'espèce bactérienne transformable la plus étudiée, aucune mention n'est faite de l'existence de marqueurs possédant des efficacités d'intégration différentes. Nous avons nous-mêmes analysé les efficacités d'un grand nombre de mutants *rif-r* et *fus-r* apparus spontanément et indépendamment dans la souche 168 de *B. subtilis*. Tous ces marqueurs s'intègrent avec rigoureusement la même efficacité que le marqueur pris comme référence. Chez *haemophilus influenzae*, sans aucun doute, il existe un effet marqueur. Mais cet effet est plus réduit, car l'écart séparant les marqueurs les plus efficaces des marqueurs les moins efficaces n'excède pas un facteur 2. Cependant nous verrons dans la discussion de ce chapitre que les processus de discrimination chez le pneumocoque et chez l'hémophile présentent néanmoins de nombreuses analogies. Enfin, chez *streptococcus sanguis* (streptocoque de groupe H), seulement deux marqueurs ont été signalés pour leur efficacité réduite par rapport à l'ensemble des marqueurs utilisés dans cet organisme (13 - 62). Les avis des spécialistes de la transformation du streptocoque sur la réalité d'une discrimination des marqueurs (question que nous avons posée à une table ronde au congrès sur la transformation à WIND RIVER RANCH, COLORADO, Juin 1972) divergeaient tellement que nous avons décidé de réexaminer ce point. Pour cela nous avons isolé une grande variété de mutants et mesuré leurs efficacités relatives dans les deux souches les plus utilisées de streptocoque, les souches *Wicky* et *Challis*.

MATERIELS ET METHODES

Organismes : Les souches réceptrices utilisées sont les souches *Challis* et *Wicky* de streptocoque du groupe H et les souches de pneumocoque R6 et R6X. Les souches de streptocoques nous ont été fournies par JON RANHAND. La souche *Wicky*, seulement transformable avec l'aide du facteur de compétence (CF), résiste à l'érythromycine (1 µg/ml) (92). Les DNA donateurs sont extraits des souches *Wicky* et R6 portant le marqueur *str-r* 41 et un ou plusieurs marqueurs isolés chez le

pneumocoque ou chez le streptocoque. Ces marqueurs seront décrits dans le texte.

Croissance et maintien des souches : Les cellules de *Challis* et *Wicky* sont mises à pousser et maintenues dans un milieu (BHI - HS) constitué par une infusion de coeurs et de cerveaux (Brain Heart Infusion, DIFCO) (37 g/l) à laquelle on ajoute 2,5 % (V/V) de sérum de cheval, préalablement inactivé par la chaleur (60° pendant 30 minutes) (92).

Les cellules de R6 et R6X sont mises à pousser dans le milieu M constitué de 10 g trypticase (BBL), 5 g néopeptone (DIFCO), 1 g Yeast Extract (DIFCO), 5 g NaCl, 1,25 g Trizma Base (SIGMA) par litre d'eau distillée. Ce milieu est stérilisé à l'autoclave ; avant de l'utiliser on ajoute du glucose stérile (concentration finale 0,2 %).

Les suspensions cellulaires des souches de streptocoque et de pneumocoque sont étalées dans le milieu M complété avec 1,25 % de gélose et 2 % de sang. Les colonies sont comptées après 25 - 30 heures pour le streptocoque et 20 heures pour le pneumocoque. Les cellules de streptocoque sont conservées à - 30° dans le milieu BHI - HS et sans glycérol. Les cellules de pneumocoque sont conservées à - 70 ° dans le milieu M contenant 10 % de glycérol stérile.

Préparation du DNA de streptocoque : Un volume de 10 ml de BHI - HS est inoculé par 0,5 ml d'une culture stationnaire dégelée de mutants de la souche *Wicky*. Les cellules sont centrifugées après 5 - 6 heures de croissance, lavées une fois avec 5 ml de Tris 0,1 M, EDTA 0,01 M, remises en suspension dans 1 ml de la même solution contenant en plus du lysozyme (1 mg/ml), et incubées pendant 20 minutes à 37°. On ajoute du sarkozyl (0,1 %) et on congèle la suspension à - 70°. Après quelques heures de congélation, le dégel progressif à la température ambiante, aboutit à la lyse des cellules. Après précipitation du DNA par 2 ml d'alcool à 95°, les fibres sont récupérées et dissoutes dans NaCl 0,3 M, citrate de sodium 0,03 M. On pourra remarquer dans les tableaux présentés dans le texte que tous les DNA ne possèdent pas la même activité biologique. Nous avons observé une corrélation entre la diminution de l'activité transformante et l'augmentation du temps séparant la lyse des cellules de l'addition de l'alcool. Cette observation suggère que des nucléases pourraient être responsables de la faible activité de quelques préparations de DNA.

Transformation du streptocoque : Les cellules de *Challis* et *Wicky* sont rendues compétentes par les méthodes décrites par RANHAND, LEONARD et COLE (92).

Challis : Des cellules dégelées de *Challis* (0,5 ml) sont diluées dans 10 ml de BHI - HS et incubées toute la nuit à 37°. On ajoute 1 ml de cette culture à 20 ml de milieu BHI - HS. Les cellules sont compétentes après 2 heures d'incubation à 37°. Les cellules compétentes sont mises en contact avec le DNA en quantité saturante, incubées pendant 30 minutes, diluées 5 fois avec du BHI - HS et

incubées 3 heures supplémentaires pour permettre l'expression de phénotype des transformées.

Wicky : On dilue 1 ml d'une culture de *Wicky* ayant poussé toute la nuit, dans 16 ml de milieu BHI - HS préchauffé. Après 50 minutes d'incubation, on ajoute 4 ml de facteur de compétence brut aux cellules en croissance. Les cellules deviennent entièrement compétentes après une incubation de 50 minutes. Les étapes ultérieures sont les mêmes que celles de *Challis*. Lorsque la souche *Wicky thy⁻* est utilisée comme réceptrice, on ajoute 50 µg/ml de thymidine au milieu. Dans notre laboratoire, le nombre relatif de transformées est toujours significativement plus élevé chez *Wicky* que chez *Challis*.

Préparation du facteur de compétence de Challis : Un volume de 5 ml d'une culture de *Challis* ayant poussé toute la nuit, est dilué dans 90 ml de BHI - HS préchauffé et 10 ml de néopeptone à 10 %. Après 3 heures d'incubation sans agitation, la culture est centrifugée (10 000 rpm/15 minutes), le surnageant est distribué dans des flacons et congelé aussitôt à - 30°. Ces surnageants dégelés sont utilisés pour induire la compétence des cellules *Wicky*.

Isolement de souches de Wicky exigeant la thymidine : La souche *W thy^{-A2}* est isolée après transformation de *Wicky* par du DNA de la souche de pneumocoque R6 *thy* portant le marqueur *thy^{-A2}* (35). La souche *W thy⁻¹* est un mutant spontané de *Wicky*.

Le crible pour la sélection des transformées ou du mutant *W thy⁻¹* est le suivant : on étale les suspensions cellulaires correspondant à des dilutions différentes d'une culture de *Wicky* ayant poussé pendant 5 heures après la transformation par du DNA ou d'une culture contrôle de *Wicky* avec du sang, 100 µg/ml de thymidine et 15 µg/ml d'aminoptérine. Les colonies résistantes sont prélevées et les cultures sont examinées pour leur capacité à pousser en absence de thymidine. Dans la culture transformée, nous avons trouvé que 90 % des colonies résistantes à l'aminoptérine étaient *thy⁻*. Dans la culture contrôle, seulement 4 colonies étaient *thy⁻*, ce qui correspond à une fréquence environ 100 fois plus faible que dans la culture transformée.

Les souches *W thy^{-A2}* et *W thy⁻¹* exigent toutes deux 50 µg/ml de thymidine. Comme dans le cas du pneumocoque, la thymine ne peut satisfaire l'exigence en thymidine.

RESULTATS

TRANSFORMATION HOMOSPECIFIQUE

Les efficacités d'intégration d'un grand nombre de marqueurs apparus

spontanément dans *Wicky* ou *Challis* sont mesurées dans la souche réceptrice *Wicky*. Deux marqueurs, l'un conférant la résistance à la streptomycine *str-r 41*, l'autre conférant la résistance à la rifampine *rif-r 1* (91) sont utilisés, suivant les cas, comme marqueur de référence. Les loci examinés sont ceux déterminant la résistance à l'acide fusidique (*fus-r*), à la rifampine (*rif-r*) et à la streptolydigue (*stg-r*). Les mutations entraînant une résistance à au moins 75 µg/ml d'acide fusidique sont liées au marqueur *str-r 41*. Ces marqueurs pourraient être des mutants du facteur G de translocation (55). Les mutations conférant la résistance à au moins 20 µg/ml de rifampine sont liées aux sites conférant la résistance à au moins 15 µg/ml de streptolydigue. Les marqueurs *rif-r* et *stg-r* pourraient être des mutants de RNA polymérase (131). Afin d'isoler des mutants indépendants d'origine spontanée, une culture de 50 ml de milieu BHI - HS préchauffé est inoculée avec des cellules de *Wicky* portant les marqueurs *str-r 41* ou *rif-r 1* (10^3 c.f. c./ml) et répartie dans 50 tubes. Après 9 à 10 heures d'incubation à 37°, le contenu de chaque tube est versé dans une boîte de Pétri et mélangé avec du milieu M gélosé contenant un des trois antibiotiques retenus. Une colonie parmi les plus larges est prélevée à partir de chaque boîte. Le DNA préparé à partir de chacune des cultures est utilisé pour transformer *Wicky* et *Challis*.

Les efficacités d'intégration de 10 marqueurs indépendants *fus-r* mesurées dans les deux souches sont indiquées dans le tableau 32. Dans les limites d'incertitude des mesures, environ $\pm 15\%$, tous ces marqueurs sont intégrés avec les mêmes efficacités aussi bien dans la souche *Challis* que la souche *Wicky*. L'analyse de 30 mutants indépendants de résistance à la rifampine et de 30 mutants de résistance à la streptolydigue montre le même résultat (tableau 33)

La représentation des marqueurs d'auxotrophie est réduite aux marqueurs *thy⁻* isolés dans *Wicky*. Ces mutants sont rendus compétents, transformés par le DNA de *Wicky thy⁺*, *str-r 41* et le nombre de transformées capables de se développer dans le milieu M sans thymidine est comparé au nombre de transformées pour la résistance à la streptomycine. En dépit d'une forte tendance à la réversion vers la prototrophie (spécialement *W thy A?*) le niveau de transformation est suffisamment élevé pour montrer que les deux marqueurs sont intégrés aussi efficacement que le marqueur *str-r 41*.

Puisque, dans la transformation du pneumocoque, les mutations induites par l'action de l'acide nitreux sur le DNA transformant se rangent dans la classe LE (103 - et chapitre VI), nous avons aussi analysé des mutants induits par l'acide nitreux dans la transformation du streptocoque. Des mutants résistants à l'acide fusidique ou à la Kanamycine sont isolés chez le streptocoque par la méthode de FREESE (32), rendue possible par la liaison entre ces marqueurs et *str-r41*. Les mutants sont isolés par transformation de *Wicky* avec du DNA *str-r 41*, *rif-r* traité à l'acide nitreux et par sélection en présence de streptomycine et de, soit la

TABLEAU 32

Efficacités d'intégration de marqueurs de résistance
à l'acide fusidique d'origine spontanée

Numéro du clone	Wicky			Challis		
	Nombre de transformées rif-r1 x 10 ⁴ /ml	Nombre de transformées fus-r x 10 ⁴ /ml	fus-r rif-r1	Nombre de transformées rif-r1 x 10 ⁴ /ml	Nombre de transformées fus-r x 10 ⁴ /ml	fus-r rif-r1
1	135	109	0,8	54	43	0,8
2	226	249	1,1	1/4	120	1,1
3	306	349	1,1	102	98	1,0
4	70	74	1,0	24	25	1,1
5	230	211	0,9	68	58	0,8
6	145	163	1,1	58	63	1,1
7	115	100	0,9	58	56	1,1
8	460	423	0,9	184	151	0,8
9	95	103	1,1	38	44	1,2
10	55	64	1,2	19	14	0,7

TABLEAU 33

*Efficacités d'intégration de marqueurs de résistance à la rifampicine
d'origine spontanée mesurées dans la souche Wicky*

Numéro du clone	Nombre de transformées str-rx10 ⁴ /ml	Nombre de transformées rif-rx10 ⁴ /ml	<i>rif-r</i> str-r41	Numéro du clone	Nombre de transformées str-rx10 ⁴ /ml	Nombre de transformées rif-rx10 ⁴ /ml	<i>rif-r</i> str-r41
1	20	20	1,0	16	415	465	1,1
2	242	297	1,2	17	325	360	1,1
3	75	70	0,9	18	520	570	1,1
4	480	580	1,2	19	325	289	0,9
5	257	307	1,2	20	285	299	1,0
6	295	377	1,3	21	427	508	1,2
7	345	422	1,2	22	387	367	0,9
8	342	342	1,0	23	390	382	1,0
9	222	302	1,4	24	250	303	1,2
10	495	575	1,2	25	419	482	1,2
11	270	225	0,8	26	65	82	1,2
12	300	355	1,2	27	407	446	1,1
13	445	512	1,2	28	365	332	0,9
14	48	55	1,2	29	385	439	1,1
15	450	545	1,2	30	322	374	1,2

kanamycine, soit l'acide fusidique après 3 heures d'expression de phénotype en liquide. Les colonies résistantes aux deux antibiotiques proviennent de l'introduction par transformation du marqueur *str-r* 41 et d'une mutation de résistance à la kanamycine ou à l'acide fusidique à un locus lié. Les efficacités d'intégration de 5 marqueurs conférant la résistance à la kanamycine et 5 marqueurs conférant la résistance à l'acide fusidique sont mesurées en prenant le marqueur *rif-r* comme référence. Tous ces marqueurs possèdent la même efficacité d'intégration que ceux décrits dans les tableaux 34 et 35.

TRANSFORMATION HETEROSPECIFIQUE

Souche réceptrice : streptocoque Wicky et Challis. Nous avons examiné le comportement dans la transformation hétérospecifique de plusieurs marqueurs de pneumocoques. Les DNA extraits de mutants résistants à la rifampine et dont les marqueurs se rangent dans les classes d'efficacités différentes dans la souche discriminante R6, sont testés dans la souche *Wicky*. Le nombre des transformées pour les deux catégories de marqueurs est indiqué dans le tableau 34.

TABLEAU 34 : Efficacités d'intégration des marqueurs de pneumocoque de résistance à la rifampine mesurées dans la souche *Wicky* de streptocoque.

Numéro du DNA	R6	Wicky		
	<i>rif-r</i> / <i>str-r</i> 41	Nombre de transformées <i>str-r</i> 41 x 10 ³ /ml	Nombre transformées <i>rif-r</i> x 10 ³ /ml	<i>rif-r</i> / <i>str-r</i> 41
1	0,12	660	315	0,48
2	0,16	685	385	0,56
3	0,20	560	425	0,64
4	0,22	175	150	0,87
5	0,25	580	255	0,44
6	0,56	620	155	0,25
7	0,60	550	320	0,58
8	0,68	716	505	0,71
9	0,94	215	60	0,28
10	0,98	445	347	0,78
11	1,00	488	395	0,81
12	1,12	500	270	0,54
13	1,48	95	36	0,38
14	1,50	614	565	0,92
15	1,65	365	170	0,47

L'on constate une variation d'environ un facteur 3 mais il n'existe aucune correspondance entre les efficacités mesurées dans la souche discriminante de pneumocoque et dans la souche *Wicky*.

Dans une autre série d'expériences, nous avons déterminé les efficacités de plusieurs marqueurs *fus-r* de pneumocoque dans les souches *Wicky* et *Challis* (tableau 35). Les marqueurs retenus ont été induits par l'hydroxylamine, l'acide

TABLEAU 35

Efficacité d'intégration de marqueurs de pneumocoque
conférant la résistance à l'acide fusidique

Origine des mutants	R6 <i>fus-r/str-p41</i>	Wicky			Challis		
		transformées <i>str-p/10³/ml</i>	transformées <i>fus-r</i> x10 ³ /ml	<i>fus-r/str-p</i>	transformées <i>str-p</i> x10 ³ /ml	transformées <i>fus-r</i> x10 ³ /ml	<i>fus-r/str-p41</i>
Induit par NH ₂ OH							
1	0,08	120	396	3,3	135	320	2,4
2	0,14	180	270	1,5	205	348	1,7
3	0,13	265	490	1,8	340	653	1,9
4	0,12	189	535	2,8	95	285	3,0
5	0,15	294	436	1,5	230	435	1,8
Induit par HNO ₂							
6	0,12	134	330	2,5	145	305	2,1
7	0,15	87	295	3,4	60	170	2,8
8	0,16	420	456	1,1	705	1200	1,7
9	0,20	159	323	2,0	525	925	1,8
10	0,20	296	352	1,2	405	625	1,5
Spontanée							
11	1,30	129	352	2,7	265	585	2,2
12	0,68	303	575	1,9	365	630	1,7
13	1,23	298	524	1,8	305	550	1,8
14	0,92	190	346	1,8	55	100	1,8
15	0,93	293	352	1,2	250	485	1,9

nitreux ou ont une origine spontanée. Ici aussi, nous obtenons une variation dans les efficacités de transformation, d'un facteur deux à trois. Cette variation n'est absolument pas reliée avec les efficacités caractéristiques de ces marqueurs chez le pneumocoque. Les efficacités de chacun des marqueurs semblent identiques dans les deux souches réceptrices du streptocoque.

Souches réceptrices : pneumocoque R6 et R6X. Nous avons transformé les souches hex^- et hex^+ de pneumocoque avec du DNA de streptocoque afin d'analyser l'influence de la fonction hex sur la transformation hétérospécifique. Nous pouvons voir dans le tableau 36 que le DNA de streptocoque n'est pas plus efficace dans la souche R6X que dans la souche R6. Pourtant la souche R6X ne discrimine pas entre les marqueurs *stg-r F*, *rif-r-27*, *str-r 53* portés par le DNA du pneumocoque, alors que ces marqueurs sont environ dix fois moins efficaces que les marqueurs *str-r 41* ou *fus-r A* dans la souche R6. Le DNA de streptocoque ne possède pas une activité biologique intrinsèquement réduite puisque ce DNA est 10 à 15 fois plus efficace que le DNA du pneumocoque dans la transformation de la souche réceptrice *Wicky*.

Le marqueur de pneumocoque à forte efficacité *str-r 41* introduit dans la souche *Wicky* sert de marqueur de référence, utile pour comparer les efficacités des marqueurs de *Wicky*. C'est ainsi que l'on peut constater que les marqueurs *fus-r 1* et *rif-r 2* portés par le DNA de streptocoque possèdent la même efficacité dans la souche réceptrice *Wicky* mais transforment la souche R6 avec des efficacités différentes. La faible efficacité d'intégration de *rif-r 2* ou de *stg-r 10* relative à *fus-r 1* est maintenue dans la souche R6X.

DISCUSSION

L'examen de plus de 80 mutants indépendants de streptocoque ne révèle aucune évidence de discrimination entre ces marqueurs. Pourtant nous avons trouvé dans la littérature deux mentions de quelques marqueurs de streptocoque possédant une faible efficacité d'intégration (13 - 62). Il semble possible que ces efficacités réduites soient dues à des mutations multisites, similaires à celles observées chez le pneumocoque, nécessitant un large déplacement d'une séquence de polynucléotides pour l'intégration du marqueur.

Bien qu'il existe une variabilité dans les efficacités d'intégration de divers marqueurs du pneumocoque dans la transformation hétérospécifique du streptocoque, cette variabilité ne ressemble en aucune manière à celle observée dans les souches discriminantes de pneumocoque.

TABLEAU 36

Etude de l'effet discriminant des souches de pneumocoque R6 et R6X
dans la transformation hétérospécifique

Souches	DNA donateur	Nombre de transformées x10 ³ /ml				Efficacité relative			
		str	fus	stg	rif	des marqueurs fus str	stg str	rif str	de transformation hétérospécifique
pneumo R6	(1) R6 str-r41 fus-r1 stg-rF	272	335	26,4		1,2	0,1		
	(2) R6 str-r 41 rif-r27	134			22,4			0,17	1
	(3) Wicky str-r41 fus-r3 stg-r10	2,5	3,0	1,4		1,2	0,6		0,009
	(4) Wicky str-r41 fus-r1 rif-r2	2,0	4,8		1,4	2,4		0,7	
pneumo R6X	(1) R6 str-r41 fus-r4 stg-rF	685	730	770		1,0	1,1		1
	(2) R6 str-r41 rif-r27	170			160			0,9	1
	(3) Wicky str-r41 fus-r3 stg-r10	11	16,4	5,1		1,5	0,5		0,016
	(4) Wicky str-r41 fus-r1 rif-r2	3,4	9,4		1,7	2,7		0,5	0,005
strepto	(4) Wicky str-r41 fus-r1 rif-r2	3200	4200		4150	1,3		1,3	1
Wicky	(1) R6 str-r41 fus-r4 stg-rF	118	305	165		2,6	1,4		0,04

Il est utile de remarquer le fait suivant : les marqueurs induits par des agents mutagènes spécifiques, tel que l'hydroxylamine, doivent toujours provoquer la même altération d'une seule paire de base. La variation observée dans les efficacités de cette catégorie de marqueurs suggère donc que la séquence des nucléotides de part et d'autre de la paire de base mutée, joue un rôle pour déterminer l'efficacité d'un marqueur dans la transformation hétérospécifique. D'autre part, il est apparent que les mutations *fus-r* dans leur ensemble sont relativement plus efficaces que les mutations *rif-r* (Tableau 34 et Tableau 35). De telles différences ont été le plus souvent interprétées comme découlant de différents degrés d'homologie ou de persistance de séquence polynucléotidique entre des souches hétérospécifiques (13).

Le comportement identique de la souche discriminante et de la souche non-discriminante vis-à-vis du streptocoque suggère que le processus de discrimination responsable de l'effet marqueur est partiellement ou complètement indépendant du processus de discrimination contre un DNA hétérospécifique.

Les efficacités d'intégration des marqueurs utilisés dans la transformation de *Haemophilus influenzae* ne diffèrent guère de plus d'un facteur 2. A l'exception de ce fait, l'effet marqueur observé chez l'hémophile est caractérisé par des propriétés très similaires à celles que nous venons de voir chez le pneumocoque. Ce sont l'hypersensibilité des marqueurs les moins efficaces à l'irradiation in vitro du DNA par les U.V. (17,18, STUY, communication personnelle), et l'effet d'exclusion exercé par les marqueurs les moins efficaces sur les marqueurs à fortes efficacités portés par la même molécule de DNA. De plus, la réduction du poids moléculaire du DNA intégré, soit artificiellement par fragmentation du DNA donateur (GOODGAL, communication personnelle), soit génétiquement par l'utilisation de certaines souches réceptrices mutantes (14) augmentent considérablement les différences d'efficacité entre les marqueurs. L'écart réduit entre les efficacités des marqueurs semble être la seule propriété qui différencie le système de discrimination de l'hémophile de celui du pneumocoque. D'après le modèle que nous avons présenté dans le chapitre VIII, cette particularité s'expliquerait par la disparition des événements létaux associés au marqueurs LE du fait que chez *Haemophilus influenzae* la longueur du brin intégré dans le génome est 2 à 3 fois plus importantes que celle du pneumocoque ($6-8 \cdot 10^6$ daltons) (84).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Nous avons entrepris une étude sur les mécanismes responsables des efficacités de transformation des marqueurs chez le pneumocoque. Les voies d'approche que nous avons utilisées sont celles de la méthodologie génétique, à savoir, l'isolement de mutants altérés dans ces mécanismes et leur étude. Pour l'analyse de ces mutants nous avons fait appel suivant les circonstances, aux techniques génétiques, à diverses techniques physico-chimiques et également dans une moindre mesure, aux techniques enzymatiques.

Nous avons cherché à relier entre eux l'ensemble des résultats obtenus, dans un modèle moléculaire explicitant les différentes étapes du processus capable de discrimination entre les divers marqueurs. Ce modèle est schématisé dans la figure 41.

Le DNA transformant fixé par les cellules compétentes est rapidement fragmenté, avant même la pénétration dans les cellules, en molécules de poids moléculaire moyen de $5 - 6 \times 10^6$ daltons (78 - 79 - 80). Le DNA exogène retrouvé à l'intérieur des cellules dans les premières minutes suivant la fixation, se présente sous forme monocaténaire par suite de la dégradation d'un des brins. Le brin résultant va s'intégrer dans le génome récepteur par déplacement de son homologue et ainsi former une structure hétéroduplex. La première étape de l'appariement pourrait être la réalisation d'une structure à trois brins entre les deux brins récepteurs et le brin donneur. La dégradation enzymatique d'un des deux brins non complémentaires aboutirait à une structure hétéroduplex en double hélice (58). L'étape précoce pourrait aussi être la fixation directe d'une partie du brin donneur à son site d'homologie partiellement sous forme monocaténaire dans les cellules compétentes. Puis par digestion exonucléolytique du brin homologue, le brin donneur s'intégrerait sur toute sa longueur. Aucune évidence pour ce type d'intégration n'a été, à ce jour, signalé chez le pneumocoque, contrairement à *B. subtilis* ou *Haemophilus influenzae* où plusieurs auteurs ont montré que seules les cellules compétentes de ces deux organismes renfermaient de nombreuses cassures et des régions en simple brin dans leur génome (DUBNAU, communication personnelle, SETLOW, communication personnelle). La longueur du brin inséré est déterminée génétiquement et ne peut être modifiée par l'utilisation de DNA transformant de poids moléculaire très élevé.

La formation de la structure moléculaire brin récepteur-brin donneur est une étape commune pour tous les marqueurs. Si nous considérons seulement les

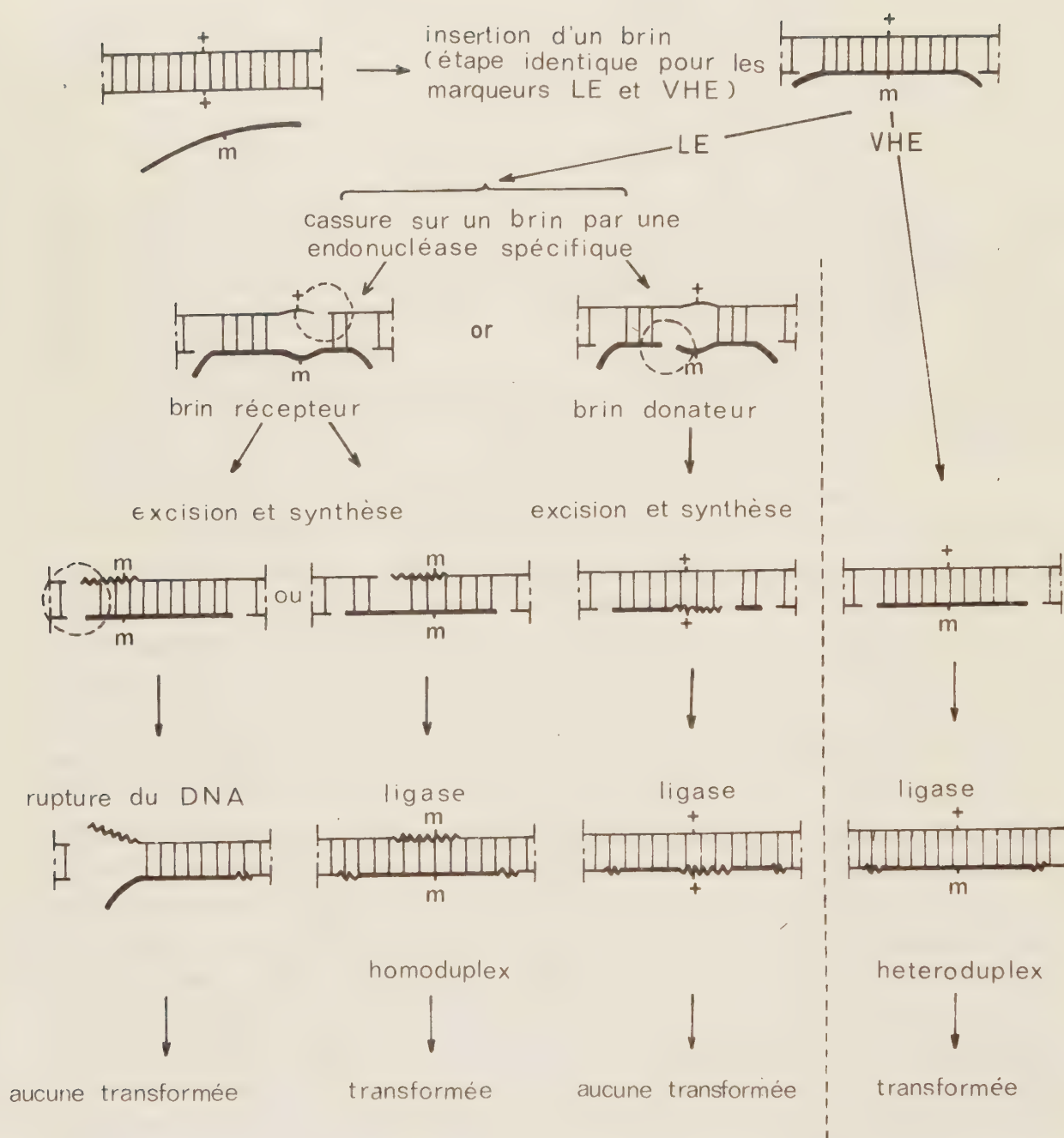


Figure 40 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES MOLECULAIRES
CONDUISANT A L'INTEGRATION DES MARQUEURS LE ET VHE DANS LA TRANSFOR-
MATION DU PNEUMOCOQUE.

mutations ponctuelles, l'hétérozygote formé par la base mutée et la base de type sauvage pourra être reconnu par une endonucléase spécifique de certaines paires de bases mal appariées. Lorsque l'hétérozygote n'est pas reconnu, l'intégration du brin exogène se poursuit par, éventuellement, l'action de nucléases et de polymérases et l'établissement des liaisons phosphodiester entre deux extrémités libres du même brin. Dans le cas où l'endonucléase reconnaît l'hétérozygote, une scission est produite sur l'un ou l'autre des deux brins. Une fois sur deux, l'incision porte sur le brin donneur et est suivie d'une dégradation exonucléolytique puis d'une synthèse corrective utilisant le brin complémentaire comme matrice. Ces événements aboutissent à l'élimination de l'hétérozygote et donc de l'information portée par le marqueur. Dans l'autre moitié des cas, ce système de correction agit sur le brin récepteur. Dans sa progression le long de ce brin, l'excision peut atteindre une extrémité encore libre sur le brin complémentaire et ainsi provoquer une rupture probablement non réparable du DNA. Une bactérie n'est transformée que lorsque la longueur du DNA excisé sera plus courte que la distance séparant le marqueur de l'extrémité du brin donneur située dans le sens de polarité de l'excision.

Ce modèle diffère de celui proposé par EPHRUSSI-TAYLOR (25) et EPHRUSSI-TAYLOR et GRAY (27) sur deux points. Le système de correction agit avec la même probabilité sur le brin récepteur et le brin donneur alors que dans l'hypothèse d'EPHRUSSI-TAYLOR le brin exogène est préférentiellement excisé par rapport au brin endogène (9 fois sur 10). De plus, les événements létaux associés à l'intégration des marqueurs LE ne sont pas invoqués dans la théorie d'EPHRUSSI-TAYLOR.

Nous pensons que ce modèle, peut-être mieux que celui d'EPHRUSSI-TAYLOR, peut rendre compte de toutes les caractéristiques associées à l'effet discriminatoire chez le pneumocoque, et cela de la façon suivante :

Selon leur efficacité individuelle d'intégration, les mutations spontanées se distribuent en quatre classes qui ne se recouvrent pas. C'est ainsi que l'on distingue les mutations à faible efficacité (LE), les mutations à efficacité intermédiaire (IE), les mutations à forte efficacité (HE) et les mutations à très forte efficacité (VHE) (58 - 108 - 113 et chapitre III). Les mutations à faible efficacité sont toujours reconnues par l'endonucléase alors que les mutations à très forte efficacité ne le sont jamais. Les deux autres types de mutations ne sont que partiellement reconnues, les mutations IE l'étant plus que les mutations HE.

Les marqueurs à faible efficacité deviennent homozygotes plus rapidement que les marqueurs à forte efficacité (25, 27, 68, 70, 112 et chapitre II). Pour le

devenir ces derniers marqueurs nécessitent l'intervention d'une fourche de duplication. De par sa nature même, le système de correction rend homozygote les marqueurs sur lesquels il agit efficacement c'est-à-dire les marqueurs LE et cela dans les minutes qui suivent l'absorption du DNA par les cellules compétentes homozygotes.

L'effet d'exclusion d'un marqueur LE sur un marqueur HE porté par la même molécule de DNA (27 - 58 - 65 - 106) s'explique par le fait que la perte d'une fraction des marqueurs LE est due à des événements létaux auxquels est associé tout marqueur HE présent sur le même fragment inséré. La génétique fine du locus *ami A* a permis d'estimer l'étendue de l'excision qui est déterminée par la distance à laquelle un marqueur LE exerce encore un effet d'exclusion sur un marqueur HE (65 - 106). Cette longueur est de l'ordre de 1000 nucléotides.

L'irradiation du DNA transformant par le rayonnement ultraviolet conduit à une inactivation sélective des marqueurs LE dans la souche discriminante (26 - 45 - 57 - 112 - 116 - et chapitres II et IX). Cette hypersensibilité des marqueurs LE par rapport aux marqueurs les plus efficaces (HE et VHE) peut résulter des deux types d'événements suivants :

1°) - Le système de correction spécifique des hétérozygotes LE agit en même temps que le système de réparation des dimères de pyrimidine. Les deux mécanismes agissant sur chacun des brins complémentaires de l'hétéroduplex, les parties excisées peuvent se chevaucher et ainsi entraîner un événement léthal par cassure du chromosome.

2°) - Le système de correction agit avant que le système de réparation des dimères de pyrimidine ne puisse le faire. Le brin néosynthétisé renferme des discontinuités correspondant à chaque dimère de pyrimidine par suite de l'incapacité des polymérases à copier des dimères de bases. La perte d'information en face d'un dimère entraînera aussi un événement léthal par l'action ultérieure du système de réparation par excision. Seules les lésions situées dans les régions dupliquées du génome seront susceptibles d'être réparées par recombinaison.

Les marqueurs HE moins sujets à l'action de la fonction *hex* sont de ce fait moins sensibles à l'inactivation par l'irradiation du DNA *in vitro*.

D'après le modèle présenté ci-dessus, la fréquence d'événements létaux associés à l'intégration des marqueurs LE est fonction de la distance qui sépare le marqueur d'une extrémité libre du brin donateur et du temps nécessaire pour établir les liaisons phosphodiesters à cette même extrémité. Il en résulte que la diminution de cette distance doit augmenter la fréquence de ces événements. Cette prévision a été vérifiée expérimentalement par l'utilisation de DNA transformant,

fragmenté jusqu'à des poids moléculaires de plus en plus réduits. Les marqueurs VHE, n'étant pas corrigés, ne sont pas tributaires de ces événements létaux et, en effet, nous avons montré que les marqueurs LE se distinguent des marqueurs HE et VHE par leur plus grande sensibilité à la fragmentation du DNA (119 et chapitre VIII).

Les événements qui conduisent à la rupture du chromosome et de là, à la perte des transformées LE, ne provoquent vraisemblablement la létalité de la cellule réceptrice que lorsque l'intégration du marqueur LE se fait dans la région du génome présente en un seul exemplaire.

Dans une population transformée, l'incidence de tels événements létaux est rare. Si on tient compte du fait que chacune des deux coques du pneumocoque sont rarement transformées pour un marqueur LE, aucune létalité sur la culture ne peut être décelée.

Le système de correction des paires de bases mal appariées ressemble au système de réparation des lésions provoquées par les UV. Les mutants sensibles aux UV que nous avons isolés ne modifient pas les efficacités de transformation des marqueurs (chapitre IX). Ceci peut signifier que les deux systèmes sont complètement ou au moins partiellement différents. Cette suggestion est renforcée par l'isolement de mutants ne discriminant plus entre les marqueurs et dont la sensibilité aux UV est normale (112 - 116 et chapitres II et IV). Quoique l'étude enzymatique ne soit que préliminaire, il semblait qu'un de ces derniers types de mutants soit déficient pour l'endonucléase spécifique des bases mal appariées (chapitre X). Les deux souches non-discriminantes de phénotype *hex*⁻ que nous avons étudiées, présentent des différences sensibles dans leur phénotype (chapitres II et IV). Il se pourrait que chacune d'elle représente des mutations dans deux gènes distincts dont les produits interviendraient dans des étapes du processus de discrimination.

Ces souches non discriminantes ont été d'une grande importance pour mettre en relief toutes les caractéristiques que nous venons de voir. Elles ont également permis d'élargir le rôle du processus de discrimination à la mutagénèse spontanée. En effet, les souches non-discriminantes diffèrent aussi des souches discriminantes par un taux de mutation spontanée plus élevé (113 - 116 et chapitres III et IV). L'augmentation du taux peut varier d'un facteur 3 à 30 suivant les loci considérés. L'interprétation de cette observation est que le système de discrimination agit sur les structures génératrices des mutations spontanées. Le système de discrimination se comporte donc comme un dispositif anti-mutation.

En fin, le système de correction peut être facilement saturé lorsque la bactérie réceptrice renferme après transformation un ou plusieurs hétéroduplex

portant un certain nombre de paires de bases mal appariées de type LE. Cette condition est réalisée quand la souche réceptrice est transformée avec un DNA de pneumocoque d'origine différente (120 et chapitre V). Ce phénomène a permis d'introduire les notions d'homologie et d'hétérologie du DNA. Il semblerait qu'une étape du système soit limitante par exemple en raison d'un nombre limité d'une molécule enzymatique active.

Ce modèle permet de proposer un certain nombre de direction de recherche. D'une part, il fournit un cadre relativement précis à l'isolement de mutants affectant le système de discrimination : il devrait être possible d'isoler des mutants altérés dans les étapes tardives de ce système permettant ainsi d'établir une relation définitive entre le système de correction et le système de réparation des dimères de pyrimidine par excision et synthèse. Il serait également intéressant d'isoler des mutants capables de discriminer entre des marqueurs portés par un DNA hétérologue. D'autre part, on peut concevoir l'étude des nucléases spécifiques des DNA renfermant des paires de bases mal appariées grâce à un substrat formé par hybridation de deux DNA hétérologues de pneumocoques.

En outre ce modèle établi pour expliquer les mécanismes de recombinaison du pneumocoque impliqués dans les DNA de structure hétéroduplex contenant des paires de bases mal appariées pourrait peut-être fournir une hypothèse de travail pour la compréhension du phénomène de conversion génique chez les organismes supérieurs.

APPENDICE

LISTE DES SOUCHES DE PNEUMOCOQUE ET DE STREPTOCOQUE MENTIONNEES DANS CETTE THESE

SOUCHES RECEPTRICES DE PNEUMOCOQUE

A - Souches dérivées de la souche Cl₃

Souches	Génotype	Isogénicité avec Cl ₃	Caractéristiques	Origine
Cl ₃	hex ⁺		souche sauvage standard	103
401	hex ⁻	oui	souche non discriminante	112
4 02	hex ⁺ uvr ⁻	oui	sensible aux U.V.	111
4 05	hex ⁺ rec ⁻	oui	sensible aux U.V.	111.
406	hex ⁻ uvr ⁻	oui	sensible aux U.V.	111
354		non	non transformable	114
355		non	non transformable - sensible aux U.V.	114
356		non	non transformable - résistante aux U.V.	114
358		non	non transformable - résistante aux U.V.	114
362 à 369		non	sensible aux U.V.	111
500		non	sensible aux U.V.	114
T6		non	sensible aux U.V.	114

B - Souches dérivées de la souche R6

Souches	Génotype	Isogénicité avec R6	Caractéristiques	Origine
R6	hex ⁺		souche discriminante standard	85
R6X	hex ⁻	oui		116
R6H	hex ⁻	oui		116
600	hex ⁺ endo ⁻ exo ⁻	oui	déficiente pour endonucléase A et exonucléase A	Cette thèse
610	hex ⁺ endo ⁻ exo ⁺	oui		"
700	hex ⁻ endo ⁻ exo ⁻	oui		"
710	hex ⁻ endo ⁻ exo ⁺	oui		"

C - Souches d'origines diverses (non capsulées)

Numéro de la souche	Autre désignation	Type capsulaire de la souche parentale	Références
654	D39R	II	Cette thèse
4	R36NC	II	74
5	R36A	II	3
	S III ₋₁	II	110
	RX	II	93
655	Lederle R	II	Cette thèse
656	RAT R	II	Cette thèse
477		I	6
662	A66R	III	7
1018	VI R	VI	7
1013	VII R	VII	7
264	VIII R	VIII	74

SOUCHES DONATRICES DE PNEUMOCOQUE

Souches	Parent	Mutations	Origine
39	C1 ₃	<i>str-r41, opt-r2, amiA-r1</i> <i>ami-B, ery-r6, ery-r2</i>	Sicard (1965)
69	C1 ₃	<i>str-r41, opt-r2, amiA-r9</i> <i>ery-r6</i>	Tiraby (1971)
119	R6X	<i>str-r41, fus-rA, sulf-d</i> <i>opt-r2, rif-r23, stg-rF</i> <i>nov-r1, thy A2, thy B</i>	Tiraby et Fox (1973)
121	R6 et 264	<i>str-r41, rif-r5, fus-rA</i> <i>ery-r2, opt-r2, nov-r1</i>	Cette thèse

SOUCHES RECEPTRICES ET DONATRICES DE STREPTOCOQUE

Challis : souche transformable du groupe H de streptocoque (*streptococcus sanguis*).

Wicky : nécessite le facteur de compétence produit par *Challis* pour devenir compétent.

L'isogénicité des souches est obtenue par le transfert au moyen de la transformation de la mutation de la souche originale dans les souches R6 ou C1₃.

B I B L I O G R A P H I E

1. - ABE, M., (1959) An intermediate stage of pneumococcus transformation as revealed by the effect of 8. azaguanine. Jap. J. M. Sc. Biol., 12 : 441-452.
2. - ALBERTS, B. M., et G. HERRICK, (1974) Methods in Enzymology N° 21 (sous presse)
3. - AVERY, O. T., C. M. MAC LEOD, et M. MCCARTY, (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. J. Exptl. Med 89 : 137-158.
4. - BALASSA, C., (1962) Action de la mitomycine`C sur la transformation du pneumocoque. Annales de l'Institut Pasteur. 102 : 547-555.
5. - BERNHEIMER, H. P., et I. E. WERMUNDSEN, (1969) Unstable binary capsulated transformants in pneumococcus. J. Bact. 98 : 1073-1079.
6. - BERNHEIMER, H. P., et I. E. WERMUNDSEN, (1972) Homology in Capsular transformation reactions in pneumococcus. Molec. gen. Genet. 116 : 68-83.
7. - BERNHEIMER, H. P., et I. E. WERMUNDSEN et R. AUSTRIAN, (1967) Qualitative differences in the behavior of pneumococcal deoxyribonucleic acids transforming to the same capsular type. J. Bact. 93 : 320-333.
8. - BISWAS, G. D. et A. W. RAVIN, (1971) Heterospecific transformation of pneumococcus and streptococcus. IV. Variations in hybrid DNA produced by recombination Molec. Gen. Genetics 110 : 1-22.
9. - BROWN, N. C., (1971) Inhibition of bacterial DNA replication by 6 - (p-hydroxyphenylazo)- uracil : Differential effect on repair and semi-conservative synthesis in *Bacillus subtilis*. J. Mol. Biol. 59 : 1-16.
10. - BRUNEL, F., A. M. SICARD et N. SICARD, (1971) Transforming ability of bacterial DNA in relation to the marker efficiencies in *Diplococcus pneumoniae* during thymidine starvation. J. Bacteriol. 106 : 904-907.
11. - CASTER, J. H., E. H. POSTEL et S. H. GOODGAL, (1970) Competence mutants: isolation of transformation deficient strains of *Haemophilus influenzae*. Nature (London) 227 : 515-517.
12. - CATO, A., et W. A. GUILD, (1968) Transformation and DNA size. I. Activity of fragments of defined size and a fit to a random double cross-over model. J. Mol. Biol. 37 : 157- 178.
13. - CHEN, K. C., et A. W. RAVIN, (1966) Heterospecific transformation of pneumococcus and streptococcus. II. Dependence of relative efficiency of marker integration on host genome. J. Mol. Biol. 22 : 123-134.
14. - CHEVALLIER, M. R., et M. L. GRETH, (1973) U. V. sensitivity of several genetic markers of *Haemophilus influenzae* DNA. Genetics 74 : 405-420.
15. - CLARK, A. J., (1971) Toward a metabolic interpretation of genetic recombination of *E. coli* and its phages. Ann. Rev. Microbiol 25 : 437-464.
16. - CLEAVER, R. J., (1971) La réparation du matériel génétique. La Recherche. 2 : 223- 230.

17. - DAY, R. S., et C. S. RUPERT, (1971) Ultraviolet sensitivity of *Haemophilus influenzae* transforming DNA. I Effect of Genetic mismatch and target size. *Mutation res.* 11 : 293-311.
18. - DAY, R. S., et C. S. RUPERT, (1971) Ultraviolet sensitivity of *Haemophilus influenzae* transforming DNA. II Reextraction Study of integration and repair. *Mutation res.* 11 : 313-324.
19. - DAWSON, M. H., (1928) The interconvertibility of "R" and "S" forms of pneumococcus. *J. Exp. Med.* 47 : 577-591.
20. - DEDDISH, P. E. et A. W. RAVIN, (1972) Relation of macromolecular synthesis to efficiency of streptococcal transformation by markers of homospecific and heterospecific origin. *Abstr. Ann. Meeting Amer. Soc. Microbiol.* G122 : 50-51.
21. - De LUCIA, P., et J. CAIRNS, (1969) Isolation of an *Escherichia coli* strain with a mutation affecting DNA polymerase. *Nature.* 224 : 1164-1166.
22. - DRAKE, J. W., (1970) The molecular basis of mutation. Holden. Day. San Francisco.
23. - DUBNAU, D., I. SMITH, P. MORELL, et J. MARMUR, (1965) Gene Conservation in *Bacillus* species, I. Conserved genetic and nucleic acid base sequence homologues. *Proc. Nat. Aca. Sci. US.* 54 : 491-496.
24. - EPHRUSSI-TAYLOR, H., (1958) The mechanism of deoxyribonucleic-acid- induced transformations, dans Tunewal, G. Ed. Recent progress in microbiology.
25. - EPHRUSSI-TAYLOR, H. (1966) Genetic recombination in DNA-induced transformation of pneumococcus. IV. The pattern of transmission and phenotypic expression of high and low efficiency donor sites in the *ami-A* locus. *Genetics.* 54 : 211-222.
26. - EPHRUSSI-TAYLOR, H., A. M. SICARD et R. KAMEN, (1965) Genetic recombination in DNA-induced transformation of pneumococcus. I. The problem of relative efficiency of transforming factors. *Genetics* 51 : 455-475.
27. - EPHRUSSI-TAYLOR, H. et T. C. GRAY, (1966) Genetic studies of recombining DNA in pneumococcal transformation. *J. Gen. Physiol.* 49 , Part 2 : 211-231.
28. - FOX, M. S., (1957) Deoxyribonucleic acid incorporation by transformed bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 26 : 83-87.
29. - FOX, M. S., (1960) Fate of transforming deoxyribonucleate following fixation by transformable bacteria. *Nature.* 187 : 1004-1006.
30. - FOX, M. S., (1962) The fate of transforming deoxyribonucleate following fixation by transformable bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 48 : 1043-1048.
31. - FOX, M. S., et M. K. ALLEN, (1964) On the mechanism of deoxyribonucleate integration in pneumococcal transformation. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 52 : 412-419.
32. - FREESE, E., (1963) Molecular mechanism of mutations, *Molecular Genetics*, Part 1, ed. J. H. TAYLOR. Academic Press, New-York : 207-269.
33. - FREESE, E., and STRACK, H. B., (1962) Induction of mutations in transforming DNA by hydroxylamine. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 48 : 1796-1803.
34. - FREESE, E., E. BAUTZ, and E. BAUTZ-FREESE, (1961) The chemical and mutagenic specificity of hydroxylamine. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 47 : 845-855.

35. - FRIEDMAN, L. R., et A. W. RAVIN, (1972) Genetic and biochemical properties of thymidine dependent mutants of pneumococcus. J. Bacteriol. 109 : 459-475.
36. - GASC, A. M. et A. M. SICARD, (1973) Mutagénèse induite par l'hydroxylamine sur l'ADN du pneumocoque. C. R. Acad. Sci. Paris 275 : 285-287.
37. - GHEI, O. M., et S. LACKS, (1967) Recovery of donor deoxyribonucleic acid marker activity from eclipse in pneumococcal transformation. J. Bacteriol. 93 : 816-829.
38. - GLOVER, S. W., (1973) Restriction of DNA in *Haemophilus influenzae* in transformation ed. Luis Archer Academic Press, London : 159-171.
39. - GOTTESMAN, M. M., M. L. HICKS, et M. GELLERT, (1973) Genetic and function of DNA ligase in *E. coli* J. Mol. Biol. 77 : 531-547.
40. - GRAY, T. C. et H. EPHRUSSI-TAYLOR, (1967) Genetic recombination in DNA induced transformation of pneumococcus. V. The absence of interference, and evidence for the selective elimination of certain donor sites from the final recombinants. Genetics 57 : 125-153.
41. - GREEN, D. M., (1959) A host specific variation affecting frequency of transformation of two markers in pneumococcus. Exptl. Cell. Res. 18 : 466-480.
42. - GRIGG, G. W., (1968) Caffeine death in *Escherichia coli*, Molec. Gen. Genetics. 102 : 316-335.
43. - GUERRINI, F., et M. S. FOX, (1968a) Genetic heterozygosity in pneumococcal transformation. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 59 : 429-436.
44. - GUERRINI, F., et M. S. FOX, (1968b) Effects of DNA repair in transformation-heterozygotes of pneumococcus. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 59 : 1116-1123.
45. - GUILD, W., et N. B. SHOEMAKER, (1974) Intracellular competition for a mismatch recognition system and marker specific rescue of transforming DNA from inactivation by ultraviolet irradiation. Molec. Gen. Genet. 128 : 291-300.
46. - GURNEY, T., Jr., et M. S. FOX, (1968) Physical and genetic hybrids formed in bacterial transformation. J. Mol. Biol. 32 : 83- 100.
47. - HASELTINE, F. P., et M. S. FOX, (1971) Bacterial inactivation of transforming deoxyribonucleate. J. Bacteriol. 107 : 889-899.
48. - HOTCHKISS, R. D., (1951) Transfer of penicillin resistance in pneumococcus by the deoxyribonucleate derived from resistant cultures. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 16 : 457-460.
49. - HOTCHKISS, R. D., (1956) in Henry Ford Hospital International Symposium, Enzymes Units of Biological Structure and Function (Academic Press, New-York) 119-130.
50. - HOTCHKISS, R. D., (1957) Isolation of sodium deoxyribonucleate in biologically active form from bacteria. Methods in Enzymology vol 3 : 692-696.
51. - HOTCHKISS, R. D., et A. H. EVANS, (1958) Analysis of the complex sulfonamide resistance locus of pneumococcus. Cold Spring Harbor Symp. Quant. 23 : 85-97.
52. - HOTCHKISS, R. D., et M. GABOR, (1970) Bacterial transformation, with special reference to recombination process. Annu. Rev. Genetics. 4 : 193-224.

53. - HOWARD-FLANDERS, P., (1968) DNA repair. *Annu. Rev. biochem.* 37 : 175-200.
54. - IYER, V. N., et A. W. RAVIN, (1962) Integration and expression of different lengths of DNA during the transformation of pneumococcus to erythromycin resistance. *Genetics.* 47 : 1355-1368.
55. - KUWANO, M., D. SCHLESSINGER, G. RINALDI, L. FELICETTI, et G. P. TOCCHINI-VALENTINI, (1971) G. Factor mutants of *E. coli* map location and properties *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42 : 441-444.
56. - LACKS, S., (1962) Molecular fate of DNA in genetic transformation. *J. Mol. Biol.* 5 : 119-131.
57. - LACKS, S., (1965) Genetic recombination in pneumococcus. In : *The physiology of gene and mutation expression*. Edited by M. KOHOUTOVA and J. HURACEK. Academia. Prague. 159-164.
58. - LACKS, S., (1966) Integration efficiency and genetic recombination in pneumococcal transformation. *Genetics* 53 : 207-235.
59. - LACKS, S., (1970) Mutants of *Diplococcus pneumoniae* that lack deoxyribonucleases and activities possibly pertinent to genetic transformation. *J. Bacteriol.* 101 : 373-383.
60. - LACKS, S., et R. D. HOTCHKISS, (1960) A study of the genetic material determining an enzyme activity in pneumococcus. *Biochim. Biophys. Acta* 39 : 503-517.
61. - LACKS, S., B. GREENBERG, et K. CARLSON, (1967) Fate of donor DNA in pneumococcal transformation. *J. Mol. Biol.* 29 : 327-347.
62. - LEONARD, G. G., D. CORLEY, et R. M. COLE, (1966) Transformation of auxotrophic mutants of Group H Streptococci. *Science* 3726 : 1255-1258.
63. - LERMAN, R. S., et L. J. TOLMACH, (1957) Genetic transformation. I. Cellular incorporation of DNA accompanying transformation in pneumococcus. *Biochim. Biophys. Acta.* 28 : 68-82.
64. - LITMAN, R. M., (1961) Genetic and chemical alteration in the transforming DNA of pneumococcus caused by ultraviolet light and by nitrous acid. *J. Chim. Phys.* 58 : 997-1004.
65. - LOUARN, J. M., (1970) Etude de la recombinaison génétique chez *Diplococcus pneumoniae*. Thèse University de Toulouse. France.
66. - LOUARN, J. M., et A. M. SICARD, (1965) Sur la sensibilité différentielle des marqueurs génétiques aux rayonnements ultraviolets, et les mécanismes de ré-activation au cours de la transformation chez *Diplococcus pneumoniae*. *C. R. Acad. Sc. Paris* 261 : 852-855.
67. - LOUARN, J. M., (1966) Action du rayonnement ultraviolet sur l'intégration des marqueurs génétiques au cours de la transformation chez *Diplococcus pneumoniae*. *GR. Acad. Sc. Paris* 262 : 325-328.
68. - LOUARN, J. M., et A. M. SICARD, (1968a) Transmission of genetic information during transformation in *Diplococcus pneumoniae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 30 : 683-689.
69. - LOUARN, J. M., et A. M. SICARD, (1968b) Identical initial steps during transformation for high and low efficiency markers in *Diplococcus pneumoniae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 33 : 461-466.

70. - LOUARN, J. M. et A. M. SICARD, (1969) Identical transformability of both strands of recipient DNA in *Diplococcus pneumoniae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 30 : 101-109.
71. - LOUARN, J. M., G. TIRABY et A. M. SICARD, (1970) Intégration des marqueurs à forte et faible efficacité chez le pneumocoque. Société Française de Génétique Centre d'Hématologie du CNRS. CHU Purpan. 31 - Toulouse Editors : 36 - 48.
72. - LURIA, S. E., et M. DELBRUCK, (1943) Mutation of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. Genetics. 28 : 491-511.
73. - MACLEOD, C. M., et M. R. KRAUSS, (1947) Stepwise intratype transformation of pneumococcus from R to S by way of a variant intermediate in capsular polysaccharide production. J. Exp. Med. 86 : 439-453.
74. - MACLEOD, C. M., et M. R. KRAUSS, (1956) Transformation reactions with two non-allelic R mutants of the same strain of pneumococcus Type VIII J. Exp. Med. 103 : 623-638.
75. - MARMUR, J., W. F. ANDERSON, L. MATTHEWS, I. BERNIS, E. GEJEWSKA, D. LANE et P. DOTY, (1961) The effects of ultraviolet light on the biological and physical chemical properties of deoxyribonucleic acids. J. Cell. Comp. Phys. 58 : 33-55.
76. - MARTIN, C., et H. EPHRUSSI-TAYLOR, (1964) Effects of partial deuteration on transforming DNA of pneumococcus. Biochim. Biophys. Acta 80 : 411-421.
77. - MARTIN, R. G., et B. N. AMES, (1961) A method for determining the sedimentation behavior of enzymes : Application to protein mixtures. J. Biol. chem. 236 : 1372-1379.
78. - MORRISON, D. A., et W. R. GUILD, (1972) Transformation and deoxyribonucleic acid size : Extent of degradation on entry varies with size of donor. J. Bact. 112 : 1157-1168.
79. - MORRISON, D. A., et W. R. GUILD, (1973) Breakage prior to entry of donor DNA in pneumococcus transformation. Biochim. Biophys. Acta 299 : 545-556.
80. - MORRISON, D. A., et W. R. GUILD, (1973) Structure of deoxyribonucleic acid on the cell surface during uptake by pneumococcus J. Bact. 115 : 1055-1062.
81. - MORSE, J. G., et L. S. LERMAN, (1969) A genetic analysis by transformation of a group of uracil-requiring mutants of *Diplococcus pneumoniae*. Genetics. 61 : 41-60.
82. - NAKAYAMA, H., S. OKUDO, et Y. TAKAGI, (1970) Repair of ultraviolet-damaged DNA in *Micrococcus lysodeikticus*. I. An endonuclease specific for ultraviolet-irradiated DNA. Biochem. Biophys. Acta. 228 : 67-82.
83. - NEWCOMBE, H. B., (1966) Origin of bacterial variants. Nature. 164 : 150-159.
84. - NOTANI, N., et S. H. GOODGAL, (1966) In Proceedings of the symposium on Macromolecular Metabolism, J. Gen. Physiol. (Suppl), 49 : 197-208.
85. - OTTOLENGHI, E., et R. D. HOTCHKISS, (1962) Release of genetic transforming agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration. J. Exp. Med-116 : 491-519.
86. - PAKULA, R., L. R. SPENCER et P. A. GOLDSTEIN, (1972) Deoxyribonuclease and competence factor activities of transformable and nontransformable group H streptococci. Can. J. Microbiol. 18 : 111-119.

86. - PAKULA, R., L. R. SPENCER et P. A. GOLDSTEIN, (1972) Deoxyribonuclease and competence factor activities of transformable and non transformable group H streptococci. *Can. J. Micro. Biol.* 18 : 111-119.
87. - PAULING, C., et L. HAMM, (1968) Properties of a temperature sensitive radiation-sensitive mutant of *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 60 : 1495-1502.
88. - PETERSON, J. M., et W. R. GUILD, (1968) Fractionated strands of bacterial deoxyribonucleic acid. III. Transformation efficiencies and rates of phenotypic expression. *J. Bacteriol.* 96 : 1991-1996.
89. - PYERITZ, R. E., R. A. SCHLEGEL et C. A. THOMAS, (1972) Hydrodynamic shear breakage of DNA may produce single-chained terminals. *Biochim. Biophys. Acta* 272 : 504-509.
90. - RADMAN, M., L. CORDONE, D. KRSMANOVIC-SIMIC, et N. ERRERA, (1970) Complementary action of recombination and excision in the repair of ultraviolet irradiation damage to DNA. *J. Mol. Biol.* 49 : 203-212.
91. - RANHAND, J. M. et R. M. COLE, (1971) Demonstration of transforming deoxyribonucleic acid in an autolysate of a group H streptococcus. *J. Bacteriol.* 106 : 712-713.
92. - RANHAND, J. M., G. G. LEONARD, et R. M. COLE, (1971) Autolytic activity associated with competent group H streptococci. *J. Bacteriol.* 106 : 257-268.
93. - RAVIN, A., (1959) Reciprocal capsular transformation of pneumococci. *J. Bacteriol.* 77 : 296-309.
94. - RAVIN, A. W., et V. N. IYER, (1962) Genetic mapping of DNA : influence of the mutated configuration on the frequency of recombination along the length of the molecule. *Genetics.* 47 : 1369-1384.
95. - RAVIN, A. W., et J. D. H. DE SA, (1964) Genetic linkage of mutational sites affecting similar characters in pneumococcus and streptococcus. *J. Bacteriol.* 87 : 86-96.
96. - RAVIN, A. W., et M. MA, (1972) Specific effects of heating of transformable streptococci on their ability to discriminate between homospecific, heterospecific and hybrid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 109 : 616-625.
97. - ROSENTHAL, P. N., et FOX, M. S., (1970) Effects of disintegration of incorporated ³H and ³²P on the physical and biological properties of DNA. *J. Mol. Biol.* 54 : 441-463.
98. - ROTHEIM, N. B. et A. W. RAVIN, (1964) Sites of breakage in the DNA molecule as determined by recombination analysis of streptomycin-resistance mutations in pneumococcus. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 52 : 30-38.
99. - SCHAEFFER, P. (1958) Interspecific reactions in bacterial transformations. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 12 : 60-74.
100. - SCHALLER, H., C. NUSSLEIN, F. J. BONHOEFFER, C. KURZ, et I. NIETZSCHMANN, (1972) Affinity chromatography of DNA binding enzymes on single-stranded DNA agarose columns. *Eur. J. Biochem.* 26 : 474-481.
101. - SHIMADA, K., et Y. TAKAGI, (1967) The effect of caffeine on the repair of U. V. damaged DNA in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 145 : 763-770.

102. - SHOEMAKER, N. B., et W. R. GUILD, (1974) Loss of IE markers at a heteroduplex stage of transformation. *Mol. gen. Gen.* 128 : 283-290.
103. - SICARD, A. M., (1964) A new synthetic medium for *Diplococcus pneumoniae*, and its use for the study of reciprocal transformations at the *ami-A* locus. *Genetics* 52 : 1207-1227.
104. - SICARD, A. M., (1965) Analyse génétique de la structure fine du locus *ami-A* chez *Diplococcus pneumoniae*. Thèse ès-Science. Paris.
105. - SICARD, A. M., et H. EPHRUSSI-TAYLOR, (1965) Genetic recombination in DNA-induced transformation of pneumococcus. II. Mapping the *ami-A* region. *Genetics*. 52 : 1207-1227.
106. - SICARD, A. M., et H. EPHRUSSI-TAYLOR, (1966) Recombinaison génétique dans la transformation chez le pneumocoque. Etude des réversions au locus *ami-A*. *C. R. Acad. Sc. Paris*. 262 : 2305-2308.
107. - SILVERSTEIN et B. M. MEHTA, (1971) Fate of *Bacillus subtilis* transforming deoxyribonucleic acid incorporated into transformable *Diplococcus pneumoniae*. *Biochem.* 10 : 683-691.
108. - SIROTNAK, F. M., et S. L. HACHTEL, (1969) Increased dihydrofolate reductase synthesis in *Diplococcus pneumoniae* following translatable alteration of the structural gene. I. Genotype derivation and recombination analyses. *Genetics*. 61 : 293-312.
109. - STUDIER, F. W., (1965) Sedimentation studies of the size and shape of DNA. *J. Mol. Biol.* 11 : 373-390.
110. - TAYLOR, H. E., (1949) Transformations réciproques des formes R et ER chez le pneumocoque. *C. R. Acad. Sc. Paris* 228 : 1258-1259.
111. - TIRABY, G., (1971) Etude des mécanismes responsables des efficacités de transformation chez *Diplococcus pneumoniae*. Thèse, Docteur de spécialité, Université Paul Sabatier, Toulouse.
112. - TIRABY, G., et A. M. SICARD, (1973a) Integration efficiency in DNA-induced transformation of pneumococcus. II. Genetic studies of a mutant integrating all the markers with a high efficiency. *Genetics*. 75 : 23- 33.
113. - TIRABY, G., et A. M. SICARD, (1973b) Integration efficiencies of spontaneous mutant alleles of *ami-A* locus in pneumococcal transformation *J. Bacteriol.* 116 : 1130-1135.
114. - TIRABY, G., J. P. CLAVERYS et A. M. SICARD, (1973) Integration efficiency in DNA-induced transformation of pneumococcus. I. A method of transformation in solid medium and its use for isolation of transformation-deficient and recombination-modified mutants. *Genetics*. 75 : 23-33.
115. - TIRABY, G., et M. S. FOX, (1973a) Marker effects in streptococcal transformation. In *Bacterial Transformation* ed. L. J. Archer Academic Press, London : 307-324.
116. - TIRABY, G., et M. S. FOX, (1973b) Marker discrimination in transformation and mutation of pneumococcus. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70 : 3541-3545.
117. - TIRABY, G., et M. S. FOX, (1974) Marker discrimination and mutagen induced alteration in pneumococcal transformation. *Genetics*, Juil, (sous presse).

118. - TIRABY, G., et M. S. FOX, (1974) On the mechanism of the hex function in mutation and transformation of pneumococcus. Proceedings of the Gatlinburg Meeting Ed. R. Grell (sous presse).
119. - TIRABY, G., et M. S. FOX. Marker discrimination and DNA size in pneumococcal transformation. Soumis à publication à Mol. Gen. Genetic.
120. - TIRABY, G., M. S. FOX, et H. BERNHEIMER, Marker discrimination in DNA-induced transformation of various pneumococcus strains. Soumis à publication à J. of Bacteriol.
121. - TIRABY, G., E. TIRABY, et M. S. FOX, Pneumococcal bacteriophages. I. Isolation and characterization of bacteriophages from pneumococci, type II. En préparation pour Nature New Biology.
122. - TIRABY, G., et H. BERHEIMER, Pneumococcal bacteriophages. II Host range of bacteriophages from pneumococci type II, among smooth and rough variants of pneumococci of various serotypes. En préparation pour Nature New Biology.
123. - TIRABY, G., et A.W. RAVIN, (1973) Recognition of streptococcal DNA by a mutant pneumococcus unable to discriminate among markers in pneumococcal DNA. Genetics. 74 : 557-562.
124. - TOMASZ, A., (1970) Cellular metabolism in genetic transformation of pneumococci: requirement for protein synthesis during induction of competence. J. Bacteriol. 101 : 860-871.
125. - TOMASZ, A., et R. D. HOTCHKISS, (1964) Regulation of the transformability of pneumococcal cultures by macromolecular cell products. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 51 : 480-487.
126. - TOMASZ, A., et J. L. MOSER, (1966) On the nature of the pneumococcal activator substance. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 55 : 58-66.
127. - TOMASZ, A., et E. ZANATI, (1971) Appearance of a protein "agglutinin" on the spheroplast membrane of pneumococci during induction of competence. J. Bacteriol. 105 : 1213-1215.
128. - TROMBE, M. C., (1972) Etude de la pléiotropie conférée chez *Diplococcus pneumoniae* par un gène de résistance à l'aminoptérine : le locus Ami-A. Thèse, Docteur de spécialité, Université Paul Sabatier - Toulouse.
129. - VOVIS, G. F., et G. BUTTIN, (1970) An ATP dependent deoxyribonuclease from *Diplococcus pneumoniae*. II. Evidence for its involvement in bacterial recombination. Biochim. Biophys. Acta. 224 : 42-54.
130. - VOGT, V. N., (1973) Purification and further properties of single-strands specific nuclease from *Aspergillus oryzae*. Eur. J. Biochem. 33 : 192-200.
131. - WEHRLI, W., et S. MATTHYS, (1971) Actions of the rifamycins. Bacteriol. Rev. 35 : 290-309.
132. - WHITEHOUSE, H. L. K., (1970) The mechanism of genetic recombination. Biol. Rev. 45 : 265-315.

S O M M A I R E

INTRODUCTION	p. 1
LA TRANSFORMATION CHEZ LE PNEUMOCOQUE	p. 2
<i>L'INTEGRATION DES MARQUEURS</i>	p. 2
<i>LES EFFICACITES DES MARQUEURS</i>	p. 3
<i>a) Classes d'efficacité</i>	
<i>b) Nature des mutations</i>	
<i>c) Mode de transmission de l'information portés par les</i> <i>marqueurs LE</i>	
<i>d) Exclusion d'un marqueur HE par un marqueur LE en posi-</i> <i>tion cis</i>	
<i>e) Action de certains agents chimiques et physiques sur le</i> <i>DNA transformant : influence sur l'efficacité</i>	
<i>f) Mécanisme responsable de la faible efficacité des mar-</i> <i>queurs LE : hypothèses.</i>	
EXPOSE DES RECHERCHES	p. 8

1ère PARTIE

ISOLEMENT ET ETUDE D'UN MUTANT AFFECTANT LE SYSTEME DE DISCRIMI-	
NATION.....	p. 9
CHAPITRE 1 : ISOLEMENT DE MUTANTS ALTERES DANS LEUR TRANSFORMABILITE OU	
DANS LEUR POUVOIR DE DISCRIMINATION.....	p. 10
MATERIELS ET METHODES.....	p. 10
<i>Souches.</i>	
<i>Milieux.</i>	
<i>Préparation du DNA de pneumocoque marqué au ^3H.</i>	
<i>Méthode de transformation en milieu liquide.</i>	
<i>Mesure de la quantité de DNA absorbé par les cellules.</i>	
<i>Mutagénèse.</i>	
<i>Irradiation des cellules à la lumière ultraviolette.</i>	
RESULTATS.....	p. 13
<i>METHODE POUR OBTENIR LA TRANSFORMATION EN MILIEU</i>	
<i>SOLIDE</i>	p. 13

METHODE POUR L'ISOLEMENT DE MUTANTS DONT LA RECOM-	
BINAISON EST MODIFIEE	p. 13
ISOLEMENT DE MUTANTS	p. 14
A - MUTANTS MODIFIES DANS LEUR POUVOIR DE TRANSFOR-	
MATION.....	p. 14
B - MUTANTS MODIFIES DANS LEUR POUVOIR DE RECOM-	
BINAISON.....	p. 17
DISCUSSION.....	p. 22
CHAPITRE II : ETUDE D'UN MUTANT DEPOURVU DE POUVOIR DE DISCRIMINATION.....	p. 24
MATERIELS ET METHODES.....	p. 24
<i>Souches.</i>	
<i>Isolement de la souche 401.</i>	
<i>Irradiation ultraviolette du DNA.</i>	
<i>Irradiation des bactéries.</i>	
<i>Préparation des complexes bactérie - DNA.</i>	
<i>Temps d'expression de phénotype et mode de séparation</i>	
<i>des transformées.</i>	
RESULTATS.....	p. 26
EFFICACITE D'INTEGRATION DE DIVERS MARQUEURS.....	p. 26
SENSIBILITE AUX RADIATIONS.....	p. 26
PENETRATION DU DNA TRANSFORMANT.....	p. 29
ABSENCE DE MODIFICATION DES MARQUEURS.....	p. 32
ABSENCE DE FACTEURS EXOCELLULAIRES RESPONSABLES DES	
EFFICACITES DES MARQUEURS.....	p. 32
MODE D'INTEGRATION DES MARQUEURS.....	p. 34
1) CINETIQUE DE DIVISION DES BACTERIES TRANSFORMEES.	p. 34
2) CINETIQUE D'APPARITION DES BACTERIES TRANSFOR-	
MEES PHENOTYPIQUEMENT EXPRIMEES.....	p. 37
3) DETERMINATION DE LA FREQUENCE DES DOUBLES TRANS-	
FORMEES DANS LES SOUCHES Cl_3 ET 401.....	p. 37
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	p. 40

2ème PARTIE

PROPRIETES DU PROCESSUS DE DISCRIMINATION.....	p. 43
CHAPITRE III : EFFICACITES D'INTEGRATION DE MUTANTS SPONTANES AU LOCUS	
<i>ami</i> A	p. 44
MATERIELS ET METHODES.....	p. 45
<i>Souches.</i>	
<i>Sélection des transformées.</i>	
<i>Isolement des mutations spontanées dans le locus <i>ami</i> A.</i>	
<i>Préparation des lysats.</i>	
<i>Mesure des taux de mutations spontanées.</i>	
RESULTATS.....	p. 47
DISTRIBUTION DES EFFICACITES D'INTEGRATION DES MUTANTS	
<i>Ami-A APPARAISSANT DANS LES SOUCHES <i>Cl</i>₃ ET 401.....</i>	p. 47
TAUX DE MUTATION SPONTANEE POUR LES MUTANTS <i>ami-r</i>	p. 51
DISCUSSION.....	p. 54
CHAPITRE IV : ACTION DU SYSTEME DE DISCRIMINATION AU COURS DE LA TRANS-	
FORMATION ET DE LA MUTAGENESE SPONTANEE.....	p. 57
MATERIELS ET METHODES.....	p. 57
<i>Souches bactériennes.</i>	
<i>Isolement de l'ADN marqué au Tritium.</i>	
<i>Mesure de l'efficacité d'intégration des marqueurs.</i>	
- <i>Mesure des taux de mutations spontanées</i>	
- <i>Distribution de l'efficacité d'intégration des mutations spontanées</i>	
- <i>Sources des antibiotiques</i>	
RESULTATS.....	p. 59
ISOLEMENT DE SOUCHES <i>hex</i> ⁻ ISOGENIQUES AVEC LA SOUCHE	
<i>R6.....</i>	p. 59
EFFICACITES D'INTEGRATION DE DIVERS MARQUEURS DANS LES	
SOUCHES <i>R6</i> ET <i>R6X</i>	p. 62
TAUX DE MUTATIONS SPONTANEEES DANS LES SOUCHES <i>R6</i> ET <i>R6X</i> ..	p. 62

<i>DISTRIBUTION DES EFFICACITES D'INTEGRATION DES MARQUEURS.....</i>	p. 66
DISCUSSION.....	p. 66
CHAPITRE V : SATURATION DU PROCESSUS DE DISCRIMINATION.....	p. 71
MATERIELS ET METHODES.....	p. 71
<i>Souches.</i>	
<i>Milieux.</i>	
<i>Préparation du DNA.</i>	
<i>Transformation.</i>	
<i>Fragmentation du DNA.</i>	
<i>Provenance des antibiotiques.</i>	
RESULTATS.....	p. 74
<i>EFFICACITES D'INTEGRATION DES DIVERS MARQUEURS DANS</i>	
<i>LES SOUCHES DERIVEES DE 939 S.....</i>	p. 74
<i>DISCRIMINATION PAR DES SOUCHES DE PNEUMOCOQUE D'ORIGINES</i>	
<i>DIVERSES ENTRE DES MARQUEURS PORTES PAR UN DNA EXTRAIT</i>	
<i>D'UNE SOUCHE HETEROLOGUE.....</i>	p. 77
<i>DISCRIMINATION PAR DES SOUCHES DE PNEUMOCOQUE D'ORIGINES</i>	
<i>DIVERSES ENTRE DES MARQUEURS PORTES PAR UN DNA HOMOLOGUE.</i>	p. 80
<i>TRANSFORMATION DE DIVERSES SOUCHES DE PNEUMOCOQUE</i>	
<i>PAR DU DNA HOMOLOGUE ET HETEROLOGUE.....</i>	p. 84
<i>SATURATION DU MECANISME DE DISCRIMINATION DES SOUCHES</i>	
<i>R6 ET 264 PAR DU DNA HETEROLOGUE DE PNEUMOCOQUE.....</i>	p. 88
<i>TRANSFORMATION DE R6 ET 264 PAR UN DNA PARTIELLEMENT</i>	
<i>HYBRIDE ENTRE LES 2 SOUCHES.....</i>	p. 88
DISCUSSION.....	p. 92
CHAPITRE VI : ESSAI DE DETERMINATION DES CONFIGURATIONS MOLECULAIRES RECON- NUES PAR LE PROCESSUS DE DISCRIMINATION.....	p. 95
MATERIELS ET METHODES.....	p. 95
<i>Traitement du DNA avec l'acide nitreux ou l'hydroxylamine</i>	
<i>Sélection des transformées et des mutants.</i>	

RESULTATS.....	p. 96
ACTION DE L'HYDROXYLAMINE SUR LE DNA TRANSFORMANT.....	p. 96
ACTION DE L'ACIDE NITREUX SUR LE DNA TRANSFORMANT.....	p. 99
ACTION DE L'EFFICACITE D'INTEGRATION DES MARQUEURS RE-	
SISTANTS A L'ACIDE FUSIDIQUE INDUITS PAR L'HYDROXY-	
LAMINE OU L'ACIDE NITREUX.....	p. 99
DISCUSSION.....	p. 104

3ème PARTIE

NATURE MOLECULAIRE DU PROCESSUS DE DISCRIMINATION.....	p. 107
--	--------

CHAPITRE VII : ABSENCE DE RELATION ENTRE L'INTEGRATION DES MARQUEURS LE	
ET LA FOURCHE DE DUPLICATION.....	p. 108

MATERIELS ET METHODES.....	p. 109
----------------------------	--------

Milieu contenant des isotopes lourds.

Mesure de l'incorporation de la thymidine.

Transformation en présence de HPURa.

Expérience de transfert de densité.

a) - Première transformation

b) - Reextraction du DNA

c) - Fractionnement du DNA dans un gradient de
chlorure de césium

d) - Mesure de la radioactivité

e) - Détermination de l'activité biologique

RESULTATS.....	p. 111
EXPERIENCES GENETIQUES IMPLIQUANT LA TRANSFORMATION DES	
CELLULES hex^+ BLOQUEES DANS LEUR SYNTHÈSE DE DNA PAR	
LE 6(p-HYDROXYPHENYLAZO) URACILE.....	p. 111
EXPERIENCES PHYSICO-CHIMIQUES IMPLIQUANT LE TRANSFERT	
DES CELLULES COMPETENTES DANS UN MILIEU CONTENANT	
DES ISOTOPES LOURDS.....	p. 114

CONCLUSION.....	p. 114
-----------------	--------

CHAPITRE VIII : AUGMENTATION DU POUVOIR DE DISCRIMINATION AVEC DU DNA

TRANSFORMANT FRAGMENTE.....	p. 118
MATERIELS ET METHODES.....	p. 118
<i>Sélection des transformées.</i>	
<i>Fractionnement du DNA dans un gradient de saccharose.</i>	
RESULTATS.....	p. 120
EFFET BIOLOGIQUE DE LA FRAGMENTATION DU DNA TRANS-	
FORMANT.....	p. 120
DISCRIMINATION DES MARQUEURS EN FONCTION DE LA LONGUEUR	
DE LA MOLECULE DE DNA.....	p. 120
EFFET DE LA FRAGMENTATION DU DNA SUR L'ACTIVITE DE	
DIVERS MARQUEURS RIF-R.....	p. 127
DISCUSSION.....	p. 127

CHAPITRE IX : ETUDE DE MUTANTS SENSIBLES A L'IRRADIATION ULTRAVIOLETTE...., p. 131

MATERIELS ET METHODES.....	p. 131
<i>Premier type de sélection.</i>	
<i>Deuxième type de sélection.</i>	
<i>Troisième type de sélection.</i>	
RESULTATS.....	p. 132
A - PROPRIETES GENERALES DES SOUCHES.....	p. 132
SENSIBILITE A L'IRRADIATION ULTRAVIOLETTE ET A	
LA MITOMYCINE.....	p. 132
EFFICACITE DE TRANSFORMATION DES DIFFERENTS	
MARQUEURS.....	p. 134
B - PROPRIETES DE DEUX MUTANTS PURIFIES.....	p. 134
ISOGENISATION.....	p. 134
TEMPS DE GENERATION ET MORPHOLOGIE DES CELLULES....	p. 135
SENSIBILITE A L'IRRADIATION ULTRAVIOLETTE ET	
AUX RAYONS X.....	p. 135
INACTIVATION DU DNA IN VITRO PAR L'IRRADIATION	
ULTRAVIOLETTE.....	p. 135
EFFICACITE DE TRANSFORMATION DES DIFFERENTS	

MARQUEURS.....	p. 138
MESURE DE L'INCORPORATION DE L'ADN RADIOACTIF.....	p. 138
DISCUSSION.....	p. 140

4ème PARTIE

ETUDE ENZYMATIQUE PRELIMINAIRE DU PROCESSUS DE DISCRIMINATION.....	p. 143
CHAPITRE X : ESSAI DE CARACTERISATION D'UNE ACTIVITE ENZYMATIQUE IMPLI- QUEE DANS LE PROCESSUS DE DISCRIMINATION.....	p. 144
MATERIELS ET METHODES.....	p. 145
<i>Préparation des DNA hétéroduplex.</i>	
<i>Isolement de souches discriminantes et non discrimi- nantes déficientes pour une ou deux désoxyribonucléases.</i>	
<i>Préparation des extraits acellulaires.</i>	
<i>Nature de l'essai enzymatique.</i>	
RESULTATS.....	p. 147
<i>ACTION DE LA DESOXYRIBONUCLEASE PANCREATIQUE SUR L'ACTIVITE DU DNA HETERODUPLEX.....</i>	
	p. 147
<i>ACTION DES EXTRAITS ACELLULAIRES DE DIVERSES SOUCHES SUR L'ACTIVITE DU DNA HETERODUPLEX.....</i>	
	p. 147
DISCUSSION.....	p. 150

5ème PARTIE

DISCRIMINATION DES MARQUEURS CHEZ LES PRINCIPALES ESPECES BACTERIEN- NES TRANSFORMABLES.....	p. 153
CHAPITRE XI : DISCRIMINATION DES MARQUEURS CHEZ LE STREPTOCOQUE.....	p. 154
MATERIELS ET METHODES.....	p. 154
<i>Organismes.</i>	
<i>Croissance et maintien des souches.</i>	

Préparation du DNA de streptocoque.

Transformation du streptocoque.

- *Challis*

- *Wicky*

- *Préparation du facteur de compétence de Challis*

- *Isolement de souches de Wicky exigeant la Thy-
midine*

RESULTATS..... p. 156

TRANSFORMATION HOMOSPECIFIQUE..... p. 156

TRANSFORMATION HETEROSPECIFIQUE..... p. 160

DISCUSSION..... p. 162

DISCUSSION ET CONCLUSION..... p. 165

APPENDICE : LISTE DES SOUCHES DE PNEUMOCOQUE ET DE STREPTOCOQUE MENTION-
NEES DANS CETTE THESE..... p. 172

BIBLIOGRAPHIE..... p. 174

